

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 7/01, 15/45, 15/86, 5/10, 9/99, C12P 21/02, A61K 48/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 <b>WO97/16538</b></p> <p>(43) 国際公開日 1997年5月9日 (09.05.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/03068</p> <p>(22) 国際出願日 1996年10月22日 (22.10.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/308315 1995年10月31日 (31.10.95)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP] 〒305 茨城県つくば市観音台一丁目25番11号 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 永井美之(NAGAI, Yoshiyuki) [JP/JP] 〒150 東京都渋谷区恵比寿南3丁目11番17号 原町住宅104号 Tokyo, (JP) 加藤 篤(KATO, Atsushi) [JP/JP] 〒205 東京都羽村市神明台2-5-33 神明台住宅807 Tokyo, (JP)</p>	<p>村井 深(MURAI, Fukashi) [JP/JP] 浅川 誠(ASAKAWA, Makoto) [JP/JP] 坂田恒昭(SAKATA, Tsuneaki) [JP/JP] 長谷川 護(HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP] 〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP) 塩田達雄(SHIODA, Tatsuo) [JP/JP] 〒158 東京都世田谷区上用賀4丁目4番9号の103 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志(SHIMIZU, Hatsushi) 〒300 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: (-)-STRAND RNA VIRUS VECTOR HAVING AUTONOMOUSLY REPLICATING ACTIVITY</p> <p>(54) 発明の名称 自律複製能を有する(-)鎖RNAウイルスベクター</p> <p>(57) Abstract A process for reconstituting virions of Sendai virus by introducing Sendai virus into a host in which early replication genes have been all expressed. This process makes it possible to produce a (-)-strand RNA virus vector with a high practical value.</p>		

(57) 要約

初期複製遺伝子が全て発現している宿主にセンダイウイルスを導入しセンダイウイルス粒子を再構成する方法を開発した。このことによって、実用価値の高い

(一) 鎖RNAウイルスベクターの製造が可能となった。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア共和国
BB	バルバドス	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BE	ベルギー	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TD	チャド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	UA	ウクライナ共和国	TG	トーゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TJ	タジキスタン
BRY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IT	イタリア	MR	モリタニア	TR	トルコ
CC	中央アフリカ共和国	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	KE	ケニア	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CH	スイス	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	US	米国
CI	コート・ジボアール	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	KR	韓国	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CN	中国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

## 明細書

### 自律複製能を有する（－）鎖RNAウイルスベクター

#### 技術分野

本発明は、遺伝子治療等に用いられるウイルスベクターに関する。詳しくは、本発明は（－）鎖RNAウイルスベクターに関する。

#### 技術背景

ヒトや動物に対する遺伝子治療において、治療効果と安全性は極めて重要な課題である。特に、ウイルスの遺伝子を組換えることにより得られる「ウイルスベクター」を用いて行われる治療は、たとえ治療効果が認められる場合でも、遺伝子が染色体DNAの不特定な位置に挿入されたり、組換え体ウイルスや病原性ウイルスが自然界に放出されたり、細胞内に導入された遺伝子発現の制御ができない等の可能性を否定できない場合には、治療行為を極めて慎重に行う必要がある。

現在、組換え体ウイルスを用いた遺伝子治療がすでに多数行われている。遺伝子治療臨床プロトコールも数多く提出されている。これらの組換え型ウイルスベクターの性質は、該ベクターが由来するウイルスの性質に多くを依存している。

ウイルスベクターの基本原理は、ウイルスの感染能を利用して目的遺伝子を標的細胞内に導入する方法である。なお、「感染能」とは、本明細書においては「細胞への接着能および膜融合能等を保持していることにより、細胞内にウイルス内部の核酸等を導入することのできる能力」のことを言う。ウイルス遺伝子に目的遺伝子を挿入する等の遺伝子操作を施した組換え型ウイルスベクターの表面には、ウイルス由来のヌクレオキャプシドやエンベロープ蛋白質等が存在しており、それが由来するウイルスの感染能を保有しているので、その内部の組換え遺伝子を細胞内に導入することが可能となる。このような組換え型ウイルスベクター

は、遺伝子治療の目的のみならず、目的遺伝子発現細胞の作製、トランスジェニック動物作製等の目的に使用することが可能である。

ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、DNAウイルスベクター、RNAウイルスベクターの3者に分類される。

遺伝子治療において現在もっとも頻度高く用いられているベクターは、レトロウイルスに由来するレトロウイルスベクターである。レトロウイルスは、以下の過程を経て複製する。まず、感染成立後、自己のRNAを鋳型とし自己由来の逆転写酵素を触媒の少なくとも一部とすることにより相補鎖DNA (cDNA) を生成し、いくつかの過程を経た後、宿主染色体DNAに挿入され、プロウイルスとなる。プロウイルスは宿種由来のDNA依存性RNA転写酵素により転写され、ウイルスRNAが生成される。ウイルスRNAは、自己のコードする遺伝子産物群によりパッケージされ、ウイルス粒子となる。

一般に遺伝子治療等に利用されているレトロウイルスベクターとは、プロウイルス生成の過程までの能力を保持するが、パッケージに必要な遺伝子を除去している欠損型ウイルスであるために、プロウイルスからウイルス粒子が形成されることがないように構築されている。レトロウイルスとしては、例えばマウス白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルス、ヒヒC型オンコウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、成人T細胞白血病ウイルス等を例示することができる。さらには、組換え型レトロウイルスベクターとして報告されているものには、マウス白血病ウイルスを基本としたもの [Virology, 65, 1202 (1991)、Biotechniques, 9, 980 (1989)、Nucleic Acids Research, 18, 3587 (1990)、Molecular and Cellular Biology, 7, 887 (1987)、Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America, 90, 3539 (1993)、Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America, 86, 3519 (1989)等]、また、ヒト免疫不全ウイルスを基本としたもの [Journal of Clinical Investigation, 88, 1043 (1991)] 等が挙げられる。

レトロウイルスベクターはこのように、特定のDNAを効率よく染色体DNAに組込むことを目的に作出されたベクターであるが、目的遺伝子の挿入位置が予想できないため、挿入失活により正常遺伝子が損傷を受けたり、癌遺伝子を活性化したり、目的遺伝子が過剰発現したり発現が抑制されたりする可能性を否定できない。この問題点を克服するために、染色体外遺伝子として利用できるDNAウイルスベクターを利用した一時的 (transient) な発現系の開発が進められた。

DNAウイルスベクターは、DNAウイルスに由来するベクターである。DNAウイルスは、ウイルス粒子内にDNAを遺伝情報として保持するものであり、そのDNAの複製は、自己のDNAを鋳型とし、宿主由来のDNA依存性DNA複製酵素を触媒の少なくとも一部とすることにより、相補鎖を生成するという過程の繰り返しによりなされる。染色体外遺伝子として利用できるDNAウイルスベクターとして、例えばアデノウイルスベクター (Adenovirus vector) では、実際の遺伝子治療例として「Nature Genetics, 3, 1-2 (1993)」を例示することができる。しかしながら、DNAウイルスベクターの場合も、核内で染色体DNAとの望ましくない組換えが生じる可能性が高く、遺伝子治療用ベクターとして用いる場合には、十分に注意を払う必要がある。

近年、上述のウイルスベクターに比べて安全性の高いと考えられる、RNAウイルスを基本としたRNAウイルスベクターが開発されつつある。RNAウイルスの複製は、自己のRNAを鋳型とし、自己由来のRNA依存性RNA複製酵素を触媒とすることにより、相補鎖を生成するという過程の繰り返しによりなされる。

(+) 鎖RNAウイルスが有するゲノムRNAは、同時にメッセンジャーRNA (以下単に「mRNA」と称する) としても機能し、複製や粒子形成に必要な蛋白質を宿主細胞の翻訳機能に依存して生産することができる。言い換えれば、(+) 鎖RNAウイルスが有するゲノムRNA自体が伝播力を有する。なお、本明細書において「伝播力」とは、「感染や人工的な手法で核酸が細胞内に導入された後、細胞内に存在する該核酸が複製後、感染性粒子またはそれに準ずる複合体を形成し、別の細胞に伝播することのできる能力」を意味する。(+) 鎖RNAウイルスに分類されるシン

ドビスウイルスや（－）鎖RNAウイルスに分類されるセンダイウイルスは、感染能と伝播力とを有する。バルボウイルス科に分類されるアデノ随伴ウイルスは、感染能を有するが、伝播力を有しない（ウイルス粒子が形成されるためには、アデノウイルスの同時感染が必要である）。また、試験管内で人工的に転写されたシンドビスウイルス由来の（＋）鎖RNAは伝播力を有する（細胞内に導入されるとウイルス粒子を形成する）が、試験管内で人工的に転写されたセンダイウイルスRNAは（＋）鎖、（－）鎖ともに伝播力を有しない（細胞内に導入されてもウイルス粒子を形成しない）。

ゲノムRNAが同時にmRNAであるという利点により、（＋）鎖RNAウイルスにおけるRNAウイルスベクターの開発が先行した [Bio/Technology, 11, 916-920 (1993)、Nucleic Acids Research, 23, 1495-1501 (1995)、Human Gene Therapy, 6, 1161-1167 (1995)、Methods in Cell Biology, 43, 43-53 (1994)、Methods in Cell Biology, 43, 55-78, 1994]。例えば、セムリキ森林ウイルス (Semliki forest virus; SFV) やシンドビスウイルス (Sindbis virus) に由来するRNAウイルスベクターは、ゲノムRNAのうち、ウイルス構造体に関わる構造遺伝子領域を欠失させ、ウイルスの転写複製蛋白質遺伝子群を残したものと、転写プロモーター下流に所望の外来性遺伝子を接続したRNAを基本的な構造としている。このようなRNAまたは該RNAを転写せしめうるcDNA [Nucleic Acids Research, 23, 1495-1501 (1995)、Human Gene Therapy, 6, 1161-1167 (1995)] を直接注射等で細胞内に導入すると、外来性遺伝子を含むRNAベクターの自律複製と転写プロモーター下流の外来性遺伝子の転写とが起こり、目的とする外来性遺伝子産物が細胞内に発現する。さらに、構造遺伝子を発現するcDNAユニット（ヘルパー）と、上記のRNAベクターを発現するcDNAユニットとをパッケージング細胞内で共存させることにより、感染能を有するが、伝播力を有しない複合体を作製することに成功した。しかし、パッケージングの途中でヘルパー由来のRNAとベクターRNAとの間で組換えが起こり、感染粒子が出現するという現象が現れた。そして、（＋）鎖RNAウイルスに特徴的な正二十

面体構造のカプシド内に存在するスパイク蛋白質がこの組換えを触媒することが判明した。そこで、スパイク蛋白質に変異を導入することによりこの問題を解決することが試みられている [Bio/Technology, 11, 916-920(1993)]。

このようにRNA自律複製能を有するベクターとして、(+)鎖RNAウイルスベクターは期待されるが、遺伝子治療用ベクターとして利用するには、以下のような問題点が存在する。

- ① 正二十面体構造のカプシドを有するため、外来性遺伝子として挿入できるサイズが、最大約3700ヌクレオチドと限られている。
- ② パッケージされた複合体から核酸が細胞に放出され複製されるまでに、細胞接着、エンドサイトーシス、膜融合、脱殻、複製酵素の翻訳という5段階もの過程が必要である。
- ③ パッケージのときに伝播力のあるウイルス粒子がごく微量形成されるという可能性が否定できない。とくに、感染力が弱まったウイルス粒子でも、内部のRNA自体は伝播力を持つので、遅発的に増幅する可能性があり、チェックすることが困難である。
- ④ 蚊等の昆虫により媒介されるウイルスに由来するため、ベクター遺伝子を導入された動物やヒトに野生型のウイルスが混合感染した場合、伝播力を有する組換え体ができる可能性があり、さらにその組換え体が昆虫により自然界に飛散する危険性がある。

以上の問題点は、もし(-)鎖RNAウイルスに由来するRNAウイルスベクターが構築されれば基本的に解決されと考えられる。すなわち、(-)鎖RNAウイルスは正二十面体構造のカプシドを保持せず、しかも粒子のエンベロープの大きさはその内部に含まれるRNAの含量によって変化することが知られており、RNAウイルスベクターとして使用する場合に、外来性遺伝子の大きさの制限は受けにくいことが推定される。また、粒子内に転写複製蛋白質群がパッケージされているため、パッケージされた複合体から核酸が細胞に放出され複製されるまでに、細胞接

着、膜融合の2段階しか要しない。さらには、ウイルスRNA単独では伝播力を有せず、かつ伝播力を有する粒子は容易に膜融合を起こして細胞内で増幅することが確認できるため、伝播力を有する粒子が存在するかどうかの検査が容易である。また、(－)鎖RNAウイルスは昆虫によって媒介されることはない。

このように(－)鎖RNAウイルスには産業的に有用なウイルスベクターの材料として利用しうる長所を多数有しているにもかかわらず、現在まで有用な遺伝子治療用(－)鎖RNAウイルスベクターは存在していない。それは、ウイルスcDNAを経由したウイルス粒子の再構成を行うことが極めて困難だったことに起因すると考えられる。即ち、外来性遺伝子をベクターに導入するためには、DNAレベルでの遺伝子操作が必要であるので、外来性遺伝子を組込んだウイルスcDNAからウイルス粒子が再構成されない限りは、(－)鎖RNAウイルスをベクターとして利用することは困難であるのである。なお、「ウイルス粒子の再構成」とは、ウイルスゲノムの核酸を人工的に作製し、試験管内または細胞内において、もとのウイルスまたは組換え体ウイルスを作製することである。

前述したように(－)鎖RNAウイルスのRNA(vRNA; viral RNA)またはその相補鎖RNA(crRNA; complementary RNA)を単独で細胞内に導入しても(－)鎖RNAウイルスは生成されないことが明らかにされている。このことは、(＋)鎖RNAウイルスの場合と決定的に違う点である。なお、特開平4-211377号公報には、「負鎖RNAウイルスのゲノムに対応するcDNAおよび感染性の負鎖RNAウイルスの製造方法」について記載があるが、該公報の実験内容がそのまま記載されている「EMBO.J., 9, 379-384(1990)」は、実験の再現性がないことが明らかとなり、筆者みずから論文内容を全面的に取り下げている(EMBO.J., 10, 3558(1991)参照)ことからして、特開平4-211377号公報に記載の技術が本発明の先行技術に該当しないのは明らかである。

(－)鎖RNAウイルスの再構成系について、インフルエンザウイルスに関しては報告がある(Annu. Rev. Microbiol., 47, 765-790(1993)、Curr. Opin. Genet. D



EV., 2, 77-81(1992))。インフルエンザウイルスは、8分節ゲノムより構成される（－）鎖RNAウイルスである。これらの報告によれば、あらかじめそのうちの1つのcDNAに外来性遺伝子を挿入し、また外来性遺伝子を含む8本すべてのcDNAから転写されたRNAをあらかじめウイルス由来のNP蛋白質と会合させてRNPとした。これらのRNPと、RNA依存性RNAポリメラーゼとを細胞内に供給することにより、再構成が成立した。また、（－）鎖一本鎖RNAウイルスについては、ラブドウイルス科に属する狂犬病ウイルスでcDNAからのウイルス再構成についての報告がある（J. Virol. 68, 713-719(1994)）。

しかし、これらの再構成技術を遺伝子治療用のベクター構築技術としてそのまま用いることは、以下の問題から困難であった。

- ① 再構成されたウイルスは、マーカー遺伝子の発現やRT-PCR等で確認を行なっているだけであり、生産量の面からベクターウイルスとして十分利用できる再構成系が確立されていない。
- ② 遺伝子治療用のベクターとして、感染能を有するが伝播力を欠如した複合体を作製するためには、（＋）鎖RNAウイルスの場合とは異なり、複合体内部に初期転写、複製に必要な因子を包含させる必要があり、このような複合体を大量に増幅させる技術は知られていない。
- ③ 再構成に必要な因子を細胞内で供給する目的で、天然型のウイルスや組換え型のワクチニアウイルス等のウイルスをcDNAが導入される細胞に同時に感染させており、それら天然型ウイルスの分離が容易でない。

さらには、RNAウイルスベクター全般に関する事項として、大量に複製、転写したRNAが治療を施したヒトや動物に対して望ましくない効果をもたらした場合に、宿主の複製や転写には影響しない、RNAウイルスベクターの複製阻害剤をあらかじめ用意しておく必要があると考えられるが、該阻害剤の開発は行われていなかった。

### 発明の開示

本発明が解決しようとする課題は、実用に耐えうる（－）鎖RNAウイルスベクターを開発することである。また、該ベクターを効率よく製造する方法を開発することである。更に、該ベクターの増殖の阻害剤を開発することである。

本発明者らはまず、（－）鎖RNAウイルスの代表格であり、安全性や利便性の点からベクターとして産業上最も有用であると考えられるセンダイウイルスをセンダイウイルスの核酸から再構成することを試みた。まず、再構成試験に適用するため、センダイウイルスDI粒子（defective interfering particle/EMBO J., 10, 3079-3085(1991)参照）由来のcDNAまたはセンダイウイルスミニゲノムのcDNAを実験材料として用いることにより、種々の検討を行なった。その結果、細胞内に導入する、cDNA、転写複製に関するcDNA群、およびT7RNAポリメラーゼ発現ユニットである組換え体ワクチニアウイルスの量比について、効率の良い条件を見いだした。本発明者らは更に、センダイウイルス全長のcDNAを（＋）鎖と（－）鎖の両者とも取得し、細胞内で（＋）鎖または（－）鎖のセンダイウイルスRNA が生合成されるようなプラスミドを構築し、転写複製に関するcDNA群を発現している細胞内に導入した。その結果センダイウイルスcDNAよりセンダイウイルス粒子を再構成することに初めて成功した。

さらに、本発明者らは、T7RNAポリメラーゼ発現ユニットである組換え体ワクチニアウイルスを用いない場合でもセンダイウイルスの再構成を行いうることを見出した。すなわち、試験管内で転写したセンダイウイルス全長RNAを細胞内に導入し、初期転写複製酵素群のcDNAをT7プロモーター支配下で転写させた場合、ウイルス粒子が再構成された。このことは、初期転写複製酵素群をすべて発現する細胞を構築すれば、ワクチニアウイルスのようなヘルパーウイルスを全く使用せずに組換え体センダイウイルス、ひいては上述の複合体を作出することが可能であることを示している。なお、初期転写複製酵素群をすべて発現する細胞は、「J.Virology, 68 8413-8417(1994)」に記載されており、該記載を参照して当業者

が作出することが可能である。なお、該文献記載の細胞は、センダイウイルス遺伝子のうち、NP、P/C、L の3者を染色体上に有している293細胞由来の細胞であり、このものは、NP、P/C、Lの3者の蛋白質を発現している。

多くのウイルスベクターの例から、核酸からウイルス粒子の再構成が効率よくできるならば、所望のウイルス遺伝子を組換えたり、外来性遺伝子を挿入したり、または所望のウイルス遺伝子を不活化させたり、欠失させることは、当業者にとって容易になしうることであることは明らかである。たとえば、センダイウイルス構造体遺伝子の少なくとも一部を欠如させ、複製酵素群の遺伝子は正常であるようなRNAを細胞内に導入した場合、初期転写および初期複製に必要な酵素群を細胞内に供給すれば、その後の自律複製が可能であることは、DI粒子を用いた報告 (J. Virol. 68, 8413-8417(1994)) から明らかである。従って、例えば「構造体遺伝子の少なくとも一部を欠如させ、複製酵素群の遺伝子は正常であるような特定のウイルスcDNA」から転写された外来性遺伝子を含むRNAを、初期転写複製酵素を含むウイルス構造体に包み込むことができれば、細胞感染能とRNA自律複製能とを有するが伝播力を欠如する外来性遺伝子のベクターとして機能する複合体を作出することができる。このような複合体は、遺伝子治療用のベクターとしては極めて有効なものである。即ち、本発明によって、(一)鎖RNAウイルスにおいて、細胞感染能とRNA自律複製能とを有するが伝播力を欠如する複合体の製造、例えば初期転写複製酵素を含む複合体の製造が可能となった。

本発明者らは更に、複合体中のRNAの欠失または不活化した遺伝子に相当する構造蛋白質を発現する細胞に該複合体を感染させて、同一の複合体を増幅する複合体の増幅方法を開発した。また、上記の複合体を増幅させるために、センダイウイルスの増殖にもっとも適する場の一つである鳥類の卵に着目し、センダイウイルスのM、F、HN 遺伝子のうち少なくとも1種類以上の遺伝子を染色体上に保持するトランスジェニック鳥類およびその卵およびその細胞が複合体の増幅に適していることを見出した。トランスジェニック鳥類の作出法は公知であり [Poltry

Sci.,65,1445-1458(1986)、Bio/Technology,12,60-63(1994)]、M、F、HN 遺伝子のうち少なくとも1種類以上の遺伝子を染色体上に保持するトランスジェニック鳥類を作出することは、当業者が適宜なしうることである。M、F、HN 遺伝子のうち、複合体に含まれるRNAの伝播力の欠如に関わる遺伝子のコードする蛋白質がトランスジェニック鳥類内に生産されることが好適である。

本発明者は更に、以上に記載した複合体を製造する方法を開発した。以下、センドライウイルスに関する場合を例示する。センドライウイルスZ株 (Viology,108, 318-324(1981)) のゲノムは15384ヌクレオチドよりなる一本鎖RNAである。その全塩基配列は逆転写酵素を用いたcDNAのクローンから決定されている (Nucleic Acids Research,11 ,7317-7330(1983)、Nucleic Acids Research,12,7965-7972(1984)、Nucleic Acids Research,14,1545-1563(1986))。ゲノムRNAは(－)鎖であるから、ウイルス粒子内に存在する転写複製酵素群はゲノムRNAを鋳型とした転写と複製とを行なう。ゲノムRNAがコードする蛋白質としては少なくとも、NP、P/C、M、F、HN、L の6種類が知られているが、このうちNPとP/CとLの3者が複製に必要な因子であることが知られており (Journal of Virology,68,8413-8417 (1994))、M、F、HNは、ウイルス構造体を構成するために必要な成分であることが判明している。以上のことから、RNAの由来する特定のRNAウイルスがセンドライウイルスである場合は、自律複製に関わる遺伝子群であるNP、P/C、L 全てと、M、F、HN遺伝子のうちRNAの伝播力の欠如に関わる遺伝子群を共に発現している細胞中に、① DNAに転写されるcDNA、② 該cDNAを細胞内で転写する際に 必要なRNAポリメラーゼをコードする遺伝子または試験管内でcDNAより転写したRNAそのものを共に導入し感染性のある複合体を再構成することができる。この場合自律複製に関わる遺伝子群、NP、P/C、L をすべてと、M、F、HN遺伝子のうちRNAの伝播力の欠如に関わる遺伝子群はたとえばこれらの遺伝子をコードしているプラスミドの細胞内導入などの一過性の発現でもかまわないが、すくなくともRNAの伝播力の欠如に関わる遺伝子群は染色体に組込まれて安定に発現する方が 好適である。

本発明者らは更に、こうして再構成した該複合体を大量に生産する方法を開発した。具体的には、該複合体を、自律複製に関わる遺伝子群は持たず、M、F、HN遺伝子のうちRNAの伝播力の欠如に関わる遺伝子群を発現している細胞に感染させ、該複合体を生産する方法である。この場合、自律複製に関わる遺伝子群は持たず、M、F、HN遺伝子のうちRNAの伝播力の欠如に関わる遺伝子群を発現している細胞は、大量生産のためには該遺伝子群を発現しているトランスジェニック鳥類の卵が好適である。

本発明者らは更に、前記のRNAと蛋白質とを含む複合体を増殖させるための細胞を作出した。具体的には、該細胞は、該複合体の保持するRNAの伝播力の欠如に関わる遺伝子群に相当する遺伝子を保持する細胞で、かつ該遺伝子のコードする蛋白質群を細胞内に生産することができる細胞である。RNAの由来する特定のRNAウイルスがセンダイウイルスである場合は、センダイウイルスのM、F、HN遺伝子のうち少なくとも1種類以上の遺伝子を染色体上に保持する細胞およびその細胞を有する動物が用いられる。なお、M、F、HN遺伝子は、野生型のものである必要はなく、野生型と同等の機能を有するものであればよい。即ち、遺伝子が細胞に機能的に導入された際、欠損ウイルスに対して、野生型と同等の相補能を有するものであればよい。細胞は、センダイウイルスの宿主とする細胞が好適である。M、F、HN遺伝子のうちベクターウイルスのRNAにおいて伝播力の欠如に関わる遺伝子群に相当する遺伝子のコードする蛋白質群が細胞内に生産されることが好ましい。

また、本発明者らは既存のRNAウイルスベクターにおいて、発現効率を高めることだけが重視されており、過剰発現により不本意な結果を招いたときに、RNAの複製を抑制する化合物の開発が行われていない点に鑑み、細胞由来のRNAの転写や翻訳には影響せず、RNA依存性RNA複製や、RNA依存性RNA転写を特異的に阻害することにより、結果としてRNA依存性RNA複製のみを抑制するような薬剤を、(一)鎖RNAウイルスベクターの阻害剤として開発した。

すなわち本発明は以下のものを含む。

(1) 伝播力を有する特定の(一)鎖RNAウイルスに由来するRNAと、核酸を含まないウイルス構造体とを含む複合体で、細胞感染能とRNA自律複製能とを有するが伝播力を欠如する複合体、

(2) 特定のRNAウイルスが非分節型(一)鎖RNAウイルスであることを特徴とする(2)記載の複合体、

(3) 特定のRNAウイルスがセンダイウイルスであることを特徴とする(3)記載の複合体、

(4) センダイウイルスRNAまたはセンダイウイルスcRNAを含むRNAで、M,F,HN蛋白質に相当する遺伝子のうち少なくとも1つ以上の遺伝子が欠失または不活化しているRNA、

(5) (4)記載のRNAと、センダイウイルス由来の核酸を含まないウイルス構造体とを含む複合体で、細胞感染能とRNA自律複製能とを有するが伝播力を欠如する複合体、

(6) (4)記載のRNAを試験管内または細胞内で転写することのできる鋳型DNAを含むDNA、

(7) 複合体内に含まれるRNAが外来性遺伝子を含むことを特徴とする(1)～(3)または(5)のいずれかに記載の複合体、

(8) 複合体内に含まれるRNAが外来性遺伝子を含むことを特徴とする(3)または(5)に記載の複合体、

(9) 外来性遺伝子を含むことを特徴とする(4)に記載のRNA、

(10) 外来性遺伝子を含むことを特徴とする(6)に記載のDNA、

(11) RNA依存性RNA複製を阻害する薬剤を含む、(1)～(3)、(5)、(7)または(8)のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAの複製阻害剤、

(12) (1)～(3)、(5)、(7)または(8)のいずれかに記載の複合体が伝播しうる宿主、

(13) (1)～(3)、(5)、(7)または(8)のいずれかに記載の複合体の、感染能に関わる遺伝子群を染色体上に有し、該複合体を感染せしめたとき、該複合体と同一のものを複製しうることを特徴とする(12)に記載の宿主、

(14) 宿主が動物、動物に由来する細胞、動物の組織または動物の卵であることを特徴とする(12)または(13)に記載の宿主、

(15) 動物が哺乳類であることを特徴とする(14)に記載の宿主、

(16) 動物が鳥類であることを特徴とする(14)に記載の宿主、

(17) (3)、(5)または(8)のいずれかに記載の複合体の、感染能に関わる遺伝子群を染色体上に有し、該複合体を感染せしめたとき、該複合体と同一のものを複製しうることを特徴とする宿主、

(18) センダイウイルスのM遺伝子、F遺伝子、HN遺伝子またはそれらと同等の機能を有する遺伝子のうち少なくとも1つ以上の遺伝子を染色体上に有する宿主、

(19) センダイウイルスのM遺伝子または同等の機能を有する遺伝子を染色体上に有する宿主、

(20) センダイウイルスのM遺伝子、NP遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子(各遺伝子は同等の機能を有する遺伝子で置換されていてもよい)を染色体上に有する宿主、

(21) センダイウイルスのM遺伝子、F遺伝子およびHN遺伝子(各遺伝子は同等の機能を有する遺伝子で置換されていてもよい)を染色体上に有する宿主、

(22) センダイウイルスのM遺伝子、F遺伝子、HN遺伝子、NP遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子(各遺伝子は同等の機能を有する遺伝子で置換されていてもよい)を染色体上に有する宿主、

(23) 宿主が動物、動物に由来する細胞、動物の組織または動物の卵であることを特徴とする(17)～(22)のいずれかに記載の宿主、

- (24) 動物が哺乳類であることを特徴とする(23)に記載の宿主、
- (25) 動物が鳥類であることを特徴とする(23)に記載の宿主、
- (26) a) (1) ~ (3)、(5)、(7)または(8)のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを生合成しうるユニット
- b) 該RNAもしくは該cRNAの複製に必要な酵素群、または該酵素群を生合成しうるユニット
- c) 該複合体の、感染能に関わる蛋白質群、または該蛋白質群を生合成しうるユニット
- の3者を含むキット、
- (27) a) (1) ~ (3)、(5)、(7)または(8)のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを生合成しうるユニット
- b) 該RNAもしくは該cRNAの複製に必要な酵素群、または該酵素群を生合成しうるユニット
- c) (12) ~ (25)のいずれかに記載の宿主
- の3者を含むキット、
- (28) a) (1) ~ (3)、(5)、(7)または(8)のいずれかに記載の複合体
- b) (12) ~ (25)のいずれかに記載の宿主
- の2者を含むキット、
- (29) a) (3)、(5)または(8)のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを生合成しうるユニット
- b) センダイウイルスのNP, P/C, L蛋白質のすべて、または該蛋白質群を生合成しうるユニット
- c) 該複合体の感染能に関わる蛋白質群、または該蛋白質群を生合成しうるユニット



ト

の3者を含むキット、

(30) a) (3)、(5)または(8)のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを生合成しうるユニット

b) センダイウイルスのNP, P/C, L蛋白質のすべて、または該蛋白質群を生合成しうるユニット

c) (17)～(25)のいずれかに記載の宿主

の3者を含むキット、

(31) a) (3)、(5)または(8)のいずれかに記載の複合体

b) (17)～(25)のいずれかに記載の宿主

の2者を含むキット、

(32) 宿主内に、(26) a), b)およびc)に記載の3者を導入することにより、(1)～(3)、(5)、(7)または(8)のいずれかに記載の複合体を製造する方法、

(33) (27) c)に記載の宿主内に、(27) a)およびb)に記載の両者を導入することにより、(1)～(3)、(5)、(7)または(8)のいずれかに記載の複合体を製造する方法、

(34) (28) a)に記載の複合体を、(28) b)に記載の宿主に感染させることにより、該複合体を増幅し製造する方法、

(35) 宿主内に、(29) a), b)およびc)に記載の3者を導入することにより、(3)、(5)または(8)のいずれかに記載の複合体を製造する方法、

(36) (30) c)に記載の宿主に、(30) a)およびb)に記載の両者を導入することにより、(3)、(5)または(8)のいずれかに記載の複合体を製造する方法、

(37) (31) a)に記載の複合体を、(31) b)に記載の宿主に感染させることにより、該複合体を増幅し製造する方法、

(38) Mに相当する遺伝子が欠失または不活化していることを特徴とする(9)に記載のRNA、

(39) M,F,HN に相当する遺伝子がすべて欠失または不活化していることを特徴とする(9)に記載のRNA、

(40) a) (38)に記載のRNA

b) (20)に記載の宿主

c) (19)に記載の宿主

の3者を含むキット、

(41) (40) a)に記載のRNAを、(40) b)に記載の宿主に導入することにより得られる複合体を、(40) c)に記載の宿主に感染させて該複合体を増幅し製造する方法、

(42) (41)の方法により製造された複合体、

(43) a) (39)に記載のRNA

b) (22)に記載の宿主

c) (21)に記載の宿主

の3者を含むキット、

(44) (43) a)に記載のRNAを、(43) b)に記載の宿主に導入することにより得られる複合体を、(43) c)に記載の宿主に感染させて該複合体を増幅し製造する方法、

(45) (44)の方法により製造された複合体、および

(46) RNA依存性RNA複製を阻害する薬剤を含む、(42)、(45)のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAの複製阻害剤、

(47) (7)記載の複合体を宿主に導入し、発現した外来性タンパク質を回収する工程を含む、外来性タンパク質の製造方法、

(48) 宿主が、伝播力に関する遺伝子のうち、(7)記載の複合体に含まれるRNAにおいて欠如している遺伝子群を発現している細胞である、(47)記載の外

来性タンパク質の製造方法、

(49)(7)記載の複合体を宿主に導入し、培養液または漿尿液を回収することによって取得しうる、発現した外来性タンパク質を含む培養液または漿尿液。

材料となる(一)鎖RNAウイルスとしては伝播力を保持するものであればいかなるものでも用いられる。DI粒子等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、材料の一部として当然使用することはできるが、全体として、伝播力を有するウイルスと同等の配列を保持していなければならない。本発明の(一)鎖RNAウイルスに含まれるウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科の(*Paramyxoviridae*)のセンダイウイルス(*Sendai virus*)、ニューカッスル病ウイルス(*Newcastle disease virus*)、おたふくかぜウイルス(*Mumps virus*)、麻疹ウイルス(*Measles virus*)、RSウイルス(*Respiratory syncytial virus*)、牛痘ウイルス(*rinderpest virus*)、ジステンバーウイルス(*distemper virus*)、オルトミクソウイルス科(*Orthomyxoviridae*)のインフルエンザウイルス(*Influenza virus*)、ラブドウイルス科(*rhabdoviridae*)の水疱性口内炎ウイルス(*Vesicular S*)、狂犬病ウイルス(*Rabies virus*)等が挙げられる。

材料となる(一)鎖RNAウイルスとしては、上記のいずれかのウイルスに由来する伝播力を保持する組換え体(一)鎖RNAウイルスを用いてもよい。組換え体(一)鎖RNAウイルスは、たとえば免疫原性に関与する遺伝子を不活性化したり、RNAの転写効率や複製効率を高めるために、一部の遺伝子を改変したものでよい。

本発明のRNAと蛋白質との複合体含まれるRNAは、前記のいずれかのウイルスまたは組換え体ウイルスのcDNAを改変したものを試験管内または細胞内で転写せしめることにより得ることができる。このとき得られるRNAは、由来するウイルスの伝播力に関わる少なくとも1つの遺伝子が欠失または不活化していることが必要であるが、自律複製に関わる遺伝子が欠失または不活化してはならない。また、DI分子など、ウイルスゲノムの両端構造を持つcDNAに、人工的に自律複製に

関わる遺伝子群を挿入したDNAを試験管内または細胞内で転写せしめることにより得られる人工的な配列を持つRNA分子も、同様に用いることが可能である。

前述のように、センダイウイルスの場合は、「自律複製に関わる遺伝子」とは、NP、P/C、Lのいずれかの遺伝子であり、「伝播力に関わる遺伝子」とは、M、F、HNのいずれかの遺伝子である。したがって、例えばM遺伝子のみを欠失させたセンダイウイルスZ株のRNAは、本発明の「複合体」に含まれる成分として適当である。また、M、F、HNすべての遺伝子が欠失や不活化させたものも、本発明の「複合体」に含まれる成分として適当である。一方、NP、P/C、Lをコードする遺伝子群がRNAから発現されることが必要である。ただし、これらの遺伝子群はウイルス由来の配列そのままでもなくとも、転写、複製における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいはほかのウイルスの相当遺伝子で代用してもよい。

本発明の「核酸を含まないウイルス構造体」とは、例えばウイルスからRNAだけを除去したものが含まれる。この構造体としては、感染能と初期の自律複製能を相補するが、伝播力は相補しないものが用いられる。センダイウイルスを例に挙げれば、M遺伝子のみを欠失させたセンダイウイルスのRNAと、センダイウイルスからRNAだけを除去したものからなる複合体は、感染能と自律複製能を有するが伝播力は有しない複合体である。複合体は、伝播力を付与しないものであれば、これら以外のものを含んでいても構わない。例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等が含まれていても構わない。

複合体に含まれるRNAは、適当な部位に外来性遺伝子が挿入されたものでもよい。所望のタンパク質を発現させるためには、所望のタンパク質をコードする外来性遺伝子を挿入する。センダイウイルスRNAにおいては、R1配列 (5'-AGGGTCAAAGT-3') とR2配列 (5'-GTAAGAAAAA-3') との間に、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい (Journal of Virology, Vol.67

,No.8,(1993)p.4822-4830)。発現効率挿入した外来性遺伝子の発現量は、遺伝子挿入の位置、また遺伝子の前後のRNA塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルスRNAにおいては、挿入位置がNP遺伝子に近いほど、挿入された遺伝子の発現量が多いことが知られている。なお、複合体を導入し、タンパク質を発現させるために用いる宿主としては、伝播力に関する遺伝子のうち、複合体に含まれるRNAにおいて欠如している遺伝子群を発現している細胞が好適に用いられる。この場合、大量生産のためには該遺伝子群を発現しているトランスジェニック鳥類の卵が特に好適である。発現されたタンパク質は、例えば、培養細胞を宿主とする場合には培養液から、鶏卵を宿主とする場合には尿漿液から、常法によって回収しうる。なお、実施例5および6においては、本出願の複合体の代わりに、伝播力のある複合体が用いられているが、本出願の複合体においても、前記の「伝播力に関する遺伝子のうち、複合体に含まれるRNAにおいて欠如している遺伝子群を発現している細胞」を宿主として用いれば、実施例における伝播力のある複合体と同様の結果が得られることは、当業者に明らかである。

なお、センダイウイルスの効率良い粒子再構成のためには、細胞内に導入するcDNAの形態が線状よりも環状のほうが良く、また（－）鎖RNAが細胞内で転写されるよりも、（＋）鎖RNAが細胞内で転写されるほうが粒子形成効率が高いことが、本発明者によって確認された。これらの条件が他のすべての（－）鎖RNAウイルス再構成に適用できるとは限らないが、他の（－）鎖RNAウイルス再構成に際しても、本明細書の記載内容および技術常識に基づいて適宜条件を検索することは可能であり、そのことにより、目的とする（－）鎖RNAウイルスベクターの 基本材料を作出する技術を確立すること、すなわちウイルスの再構成系を確立することが可能であることは明らかである。

本発明における「RNAの複製阻害剤」としては、RNA依存性RNA複製を阻害する薬剤であれば、いかなるものでも適用可能であるが、例えば、リバビリン (Ribavirin)、TJ13025等が好適に用いられる。かかる複製阻害剤は、例えば、細胞内で

の組換え体RNAの増幅に伴う健康状態悪化が観察されたとき、または細胞内での組換え体RNA由来の外来性遺伝子等の発現を制御したい場合等に有効である。

なお、本発明の一態様としての、M遺伝子が欠損したセンダイウイルスcDNAから本発明に含まれる複合体を製造し（A→Bの過程）、更に該複合体を増幅する（B→Cの過程）工程を、図1として例示する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、M遺伝子が欠損したセンダイウイルスcDNAから本発明に含まれる複合体を製造し（A→Bの過程）、更に該複合体を増幅する（B→Cの過程）工程を説明する図である。

図2はpUC18/T7(+)HVJRz.DNAの構成を示す図である。

図3はpUC18/T7(-)HVJRz.DNAの構成を示す図である。

図4はCV-1細胞へのSeVgp120の感染後の時間とHAUの値及びgp120の発現量との関係を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

##### [実施例1] センダイウイルス転写ユニットpUC18/T7(-)HVJRz.DNAおよびpUC18/T7(+)HVJRz.DNAの作製

T7 プロモーター、(-)鎖RNAが転写されるように設計されたセンダイウイルスcDNA、リボザイム遺伝子をこの順に保持するDNAを、pUC18プラスミドに挿入したプラスミドpUC18/T7(-)HVJRz.DNAを作製した。また、T7 プロモーター、(+)鎖RNAが転写されるように設計されたセンダイウイルスcDNA、リボザイム遺伝子をこの順に保持するDNAを、pUC18プラスミドに挿入したプラスミドpUC18/T7(+)HVJRz.DNAを作製した。pUC18/T7(-)HVJRz.DNAおよびpUC18/T7(+)HVJRz.DNAの構成を図2お

よび図3に示した。

**[実施例2] cDNAからのセンダイウイルス再構成実験**

直径6cmのプラスチックシャーレに通常のトリプシン処理を施したLLC-MK2細胞を2,000,000個とMEM培地(MEM +FBS 10%) 2mlとを添加し、CO<sub>2</sub> 5%, 37°Cの条件下で24時間培養した。培養液を取り除き、1mlのPBSを用いて洗浄した後、多重感染度(moi/multiplicity of infection)が2となるように調製した、T7ポリメラーゼを発現する組換えワクチニアウイルスvTF7-3を0.1mlのPBSに懸濁したものを添加した。15分毎にウイルス液が全体にいきわたるようにシャーレを揺らし、1時間の感染を行った。ウイルス溶液を除去し、1mlのPBSを用いて洗浄した。このシャーレに、cDNA溶液を含む培地を添加した。cDNA溶液を含む培地の作製は、以下のように行なった。

表に記した核酸(センダイウイルスの複製に必要な因子を発現するプラスミド、pGEM-L, pGEM-P/C, pGEM-NPを含む)を1.5mlのサンプリングチューブにとり、HBS(Hepes buffered saline; 20mM Hepes pH7.4, 150mM NaCl)を加えて総量を0.1mlにした。表中の(-)または(+)cDNAは、プラスミドpUC18/T7(-)HVJRz.DNAまたはpUC18/T7(+)HVJRz.DNAそのものを示し、/Cは環状のまま、/Lは制限酵素MluIにより直鎖化した後に細胞に導入していることを示す。

他方、ポリスチレンチューブの中で、HBS 0.07ml, DOTAP(ベーリンガーマンハイム社製)0.03mlを調合し、核酸溶液をこのポリスチレンチューブに移した。この状態で、10分静置した。これに、細胞培養液(2ml MEM +FBS 10%)を添加した。さらにこの中にワクチニアウイルスの阻害剤であるリファンピシン(Rifampicin)とシトシンアラビノシドC(Cytosin arabinoside C/Ara C)を最終濃度がそれぞれ0.1mg/ml, 0.04mg/mlとなるように添加した。これにより、cDNA溶液を含む培地が作製された。

前記のシャーレを40時間CO<sub>2</sub> 5%, 37°Cの条件下で培養した。ラバーポリスマンを用いてシャーレ内の細胞をかき取り、エッペンドルフチューブに移し6000rpm、

5分間の遠心を行って細胞成分だけを沈殿し、再度1mlのPBSに懸濁した。この細胞液の一部をそのままの状態、あるいは希釈して10日齢の発育鶏卵に接種した。この細胞液を第1表に示した細胞数となるようにPBSで希釈し、0.5ml接種した卵を35°C72時間培養後4°Cに移して一晩置いた。この卵の漿尿液をウイルス液として注射器と注射針を用いて回収した。

回収したウイルス液のHAU (hemmagglutinin unit)と、PFU(plaque forming unit)の測定を以下に示す方法で行った。

HAUの測定は以下のように行なった。鶏の血液を、400x g,10分間遠心し、上清を捨てた。残る沈殿を、沈殿の100倍量のPBS(-)で懸濁し、これをさらに400x g,10分間遠心し、上清を捨てた。この操作をさらに2回、繰り返して、0.1%血球溶液を作製した。ウイルス溶液を段階希釈法により2倍ずつに希釈し、その0.05mlずつを、96穴のタイタープレートに分注した。このタイタープレートに、さらに0.05mlずつの血球溶液を分注し、軽く振動させてよく混ぜた後、4°Cで40分静置した。その後、赤血球の凝集を肉眼で観察し、凝集したもののうち、もっともウイルス溶液の希釈率の高いものの希釈率を、HAUとして示した。

PFUの測定は以下のように行なった。CV-1細胞を、6穴のカルチャープレート上に単層になるように生育させた。カルチャープレートの培地を捨て、段階希釈法により10倍ずつに希釈したウイルス溶液0.1mlずつをそれぞれのカルチャープレート内ウエルに分注し、37°C、1時間感染させた。感染中に血清の含まれていない2×MEMと2%寒天を55°Cで混ぜ合わせ、さらに最終濃度0.0075mg/mlとなるようにトリプシンを加えた。1時間の感染後、ウイルス溶液を取り除き、寒天と混合した培地3mlずつをそれぞれのカルチャープレート内ウエルに加え、5%CO<sub>2</sub>条件下で37°C3日間保温した。0.2mlの0.1%フェノールレッドを加え、37°C 3時間保温した後、取り除いた。色の付いていないブランクの数を数え、ウイルスの力価をPFU/mlとして評価した。

表1には、LLC-MK2細胞に導入した鋳型となるセンダイウイルスcDNA、RNA複製



に必要な因子のcDNAであるpGEM-L、pGEM-P/CおよびpGEM-NPの量、インキュベーション時間、鶏卵に接種した細胞数、HAU、PFU をそれぞれ示した。

表 1

鋳型cDNA	合計 (μg)	pGEM-L(μg)	pGEM-P/C(μg)	pGEM-NP(μg)	培養時間 (時)	細胞数	HAU	PFU
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^5$	512	$2 \times 10^9$
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^5$	256	$9 \times 10^8$
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^6$	256	$9 \times 10^8$
(+)cDNA/L	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^5$	<2	<10
(+)cDNA/L	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^5$	<2	<10
(+)cDNA/L	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(-)cDNA/L	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^4$	<2	<10
(-)cDNA/L	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^5$	<2	<10
(-)cDNA/L	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(-)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^4$	<2	<10
(-)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^5$	<2	<10
(-)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^6$	4	$8 \times 10^3$

HAU、PFUをともに示したサンプルを超遠心で沈渣とした後、再浮遊して20%～60%のショ糖密度勾配遠心で精製し、12.5%SDS-PAGEで蛋白質を分離したところ、ここに含まれる蛋白質は、センダイウイルスの蛋白質と同じ大きさのものであった。

この結果から、cDNAを細胞に導入してセンダイウイルスを再構成できることが示された。また、(+)鎖を転写するcDNAを細胞内に導入したときには、(-)鎖を転写するcDNAを導入したときに比べてウイルス粒子が効率よく再構成されることが示された。さらに、cDNAを環状のままで導入したときには、直鎖状にして導入したときに比べてウイルス粒子が効率よく再構成されることが示された。

### [実施例 3] センダイウイルス再構成に必要なRNA複製因子の検討

L, P/C, NPを発現するプラスミドが三者ともに必要かどうかを調べる実験を行った。方法は実施例 2 と同様であるが、実施例 2 ではcDNAとともに、pGEM-L, pG

EM-P/C, pGEM-NPの3者を細胞内に導入したのに対し、本実験では、pGEM-L, pGEM-P/C, pGEM-NPのうちの任意の2者または一者のみをcDNAとともに細胞内に導入した。

表2は、LLC-MK2細胞に導入した鋳型となるセンダイウイルスcDNA、RNA複製に必要な因子のcDNAであるpGEM-L、pGEM-P/CおよびpGEM-NPの量、インキュベーション時間、鶏卵に接種した細胞数、HAU、PFUをそれぞれ示した。

表2

鋳型cDNA	合計 (μg)	pGEM-L	pGEM-P/C	pGEM-NP	培養時間 (時)	細胞数	HAU	PFU
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^5$	256	$6 \times 10^8$
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^6$	512	$4 \times 10^9$
(+)cDNA/C	10	0	2	4	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	0	2	4	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	0	4	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	0	4	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	2	0	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	2	0	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	0	0	4	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	0	0	4	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	0	2	0	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	0	2	0	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	0	0	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	0	0	40	$1.00 \times 10^6$	<2	<10

表2から、どの組合わせの2者を導入した場合もウイルスの生産が認められなかった。この結果、この3種の蛋白質すべてが、再構成には必須であることが確認された。

#### [実施例4] in vitro転写RNAからのセンダイウイルス再構成実験

実施例2で、cDNAからセンダイウイルスが再構成されることを示したが、さらにcDNAをin vitroで転写した産物、すなわちvRNA および cRNAでも同様のことができうるかどうかを検討した。

センダイウイルス転写ユニットpUC18/T7(-)HVJRz.DNAおよびpUC18/T7(+)HVJRz.DNAを制限酵素MluIで直鎖状にした後、これを鋳型として用い、精製T7ポリメラーゼ(EPICENTRE TECHNOLOGIES: Ampliscribe T7 Transcription Kit)によるin vitro RNA合成を行った。in vitro RNA合成の方法はキットのプロトコルに従った。ここで得られたRNA産物を、実施例2のcDNAの代わりに用い、同様の実験を行い、ウイルス生産の評価はHA試験により行った。

結果を表3に示す。

表3

鋳型cDNA	合計 (μg)	pGEM-L(ug)	pGEM-P/C(ug)	pGEM-NP(ug)	培養時間(時)	細胞数	HAU	PFU
in vitro(-)RNA	10	4	2	4	40	1.00E+06	512	2×10 <sup>9</sup>
in vitro(-)RNA	10	4	2	4	40	1.00E+06	512	ND
in vitro(+)RNA	10	4	2	4	40	1.00E+06	2	5×10 <sup>3</sup>
in vitro(+)RNA	10	4	2	4	40	1.00E+06	<2	ND

この結果より、どちらのセンスのRNAを細胞内に導入しても、ウイルスを再構成することができた。

#### [実施例5] センダイウイルスベクター内に挿入した外来遺伝子の宿主内での発現の検討

(1) 外来遺伝子(HIV-1 gp120遺伝子)が挿入されたセンダイウイルスベクター「pSeVgp120」の調製

プライマーa (5'-TGCGGCCGCCGTACGGTGGCAATGAGTGAAGGAGAAGT-3') (配列番号: 1) 及びプライマーd (5'-TTGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTACTACGGC GTACGTCATCTTTTTTCTCTCTGC-3') (配列番号: 2) を用い、「pNI432」上のHIV-1

gp120遺伝子を標準的なPCR法により増幅した。TAクローニングを行い、NotIで消化し、これをNotIで消化した「pSeV18<sup>+</sup>」に挿入した。次いで、これをE.Coliに形質転換し、E.Coliの各コロニーのDNAを「Miniprep」法で抽出し、DraIII消化後電気泳動を行い、泳動されたDNAのうち挿入により期待される大きさのDNA断片を含んでいることが確認されたクローンを選抜することで、陽性クローンを得た（以下、この陽性クローンを「クローン9」と称する）。目的の塩基配列であることを確認後、塩化セシウム密度勾配遠心により、DNAを精製した。なお、これにより得られた、gp120の挿入されたpSeV18<sup>+</sup>を「pSeVgp120」と称する。

(2) pSeVgp120を保持するセンダイウイルス (SeVgp120) の再構成及びgp120の発現の解析

LLCMK2細胞にpGEM NP, P,Lの他に、さらにpSeVgp120を導入した以外は、実施例2と同様の方法で、発育鶏卵のしょう尿液を回収し、HAUの測定及びgp120発現の検討 (ELISA) を行った。HAUの測定は、実施例2と同様の方法で行った。

また、ELISAは以下のように行った。HIV-1に対するモノクローナル抗体で覆った96ウェルプレートに100 $\mu$ lの試料を添加し、37°Cで60分反応させた。PBSで洗浄後、100 $\mu$ lのHRP結合抗HIV-1抗体を添加し、37°Cで60分反応させた。これをPBSで洗浄後、テトラメチルベンチジンを添加し、HRP活性で転換される反応生成物の量を酸性条件下、450nmの吸光度で検出することによりgp120の発現量を測定した。この結果を表4左に示す。

また、得られたウイルス液は、CV-1細胞に感染させ、同様の検討を行った。CV-1細胞を1プレート当たり5x10<sup>5</sup>細胞となるようにまいて生育させ、培地を捨て、PBS(-)で洗浄し、感染多重度10でウイルス液を添加し、室温で1時間感染させた。ウイルス液を捨てPBS(-)で洗浄し、plainMEM培地 (MEM培地に抗生物質AraC, Rif及びトリプシンを添加したもの) を添加して、37°Cで48時間反応させた。反応後、培地を回収し、HAUの測定 (実施例2と同様の方法) 及びgp120発現の検討 (ELISA) を行った。この結果を表4中央に示す。なお、CV-1細胞の培養上清を再度発

育鶏卵に接種し、これにより得たウイルス液のHAUの測定結果及びgp120発現の検討 (ELISA) 結果を表4右に示す。

表4

尿漿液(F1) gp120(HAU)	CV-1 培地(F1) gp120(HAU)	(μg/ml) 尿漿液(F2) gp120(HAU)
0.10(4) 0.15(32) 0.05(32)	3.46(128) 1.81(128) 2.20(128)	1.56, 1.21(512, 512)

表4から明らかなように、CV-1細胞で特に高濃度のgp120が生産され (表中央)、また再度発育鶏卵に接種した尿しょう液からも高濃度のgp120が検出された (表右)。なお、表4左と表4中央には3クローンの結果を示してある。

さらに、gp120の発現をウエスタンブロッティング法により解析した。SeVgp120を感染させたCV-1細胞の培地を20,000rpmで1時間遠心し、ウイルスを沈殿させ、その上清をTCA (10%(v/v)、氷上で15分) または70%エタノール (-20°C) で処理し、15,000rpmで15分遠心し、沈降した蛋白質を「SDS-PAGE Sample buffer」(第一化学) と混合し90°Cで3分反応させ、10%アクリルアミドゲル上でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動後、蛋白質をPVDF膜 (第一化学) に転写し、モノクローナル抗体902を室温で1時間反応させた。次いで、T-TBSで洗浄し、抗mIgG (アマシャム社) を室温で1時間反応させ、T-TBSで洗浄した。さらに、HRP結合プロテインA (アマシャム社) を室温で1時間反応させ、T-TBSで洗浄した。これに4-クロロ-1-ナフトール (4CNPlus) (第一化学) を添加し、gp120を検出した。この結果、予想されるgp120の分子量の位置にバンドが検出された。

さらに、CV-1細胞へのSeVgp120の感染後の時間とHAUの値及びgp120の発現量と

の関係を解析した。10cmプレートに $5 \times 10^6$ 細胞となるようにCV-1細胞をまき、感染多重度10でSeVgp120を感染させ、その後30, 43, 53, 70時間目に1mlの培地を回収し、等量の新鮮培地と混合して、HAUの測定、gp120発現の検討（ELISA）およびウエスタンブロッティングを行った。この結果を図4に示す。図4から明らかなように、センダイウイルスのHAタイターの増加に伴ってgp120生産量も増加する傾向を示した。

〔実施例6〕 種々の型の細胞におけるSeVgp120の増殖及びgp120の発現の解析

種々の型の細胞を用いた以外は実施例5と同様の方法で、HAUの測及びgp120発現の検討（ELISA）を行った。この結果を表5に示す。

表 5

細胞型	時間（感染後）	HAU	gp120 ( $\mu$ g/ml)
CV-1	96	32	2.5
LLCMK2	48	16	0.5
CHO	55	4	0.46
NIH3T3	48	4	0.25
MT4	24	16	0.8
MOLT4	24	16	1.2

なお、表左は種々の型の細胞へのSeVgp120の感染後の時間を示す。この結果、検討を行ったすべての細胞でSeVgp120の増殖及びgp120の発現が検出された。

〔実施例7〕 センダイウイルスベクター内に挿入したルシフェラーゼ遺伝子の宿主内での発現の検討

ベクター挿入用のルシフェラーゼ遺伝子を単離するため、プライマー（5'-AAGCGGCCGCAAAGTTCACGATGGAAGAC-3' (30mer)）（配列番号：3）及びプライマー（5'-TGCGGCCGCGATGAACCTTTCACCCTAAGTTTTCTTACTACGGATTATTACAATTTGGACTTTCGCCCC-3' (69mer)）（配列番号：4）を用い、鋳型として「pHvluciRT4」を用いて、標準的なPCR法により両端にNotI部位の付加したルシフェラーゼ遺伝子を単離した。次

いで、これをNotIで消化したpSeV18<sup>+</sup>に挿入し、ルシフェラーゼ遺伝子が挿入されたセンダイウイルスベクターを得た。次いで、LLCMK2細胞に導入し、発育鶏卵に接種した。発育卵のしょう尿膜を切り取り、冷PBS(-)で2回洗浄し、「lysis buffer」(Picagene WACO) 25 $\mu$ lを添加し、よく攪拌してから15000rpmで2分間遠心した。その上清を5 $\mu$ lを採取し、基質(IATRON) 50 $\mu$ lを添加し、96ウェルプレートに入れ、ルミノメーター(Luminous CT-9000D, DIA-IATRON)で蛍光強度を測定した。活性は、cps (counts per second) で表した。この結果、感染後24時間目のCV-1細胞で、特に高いルシフェラーゼ活性が検出された(表6)。なお、ルシフェラーゼ遺伝子の導入されていないセンダイウイルスを対照として用いた(表中の「SeV」で示してある)。また、表には2クローンの検出結果を示した。

表 6

	蛍光強度 (counts/10 sec)	
	尿膜膜	CV-1 (感染後 24 時間目)
Luc/SeV	669187	
	2891560	8707815
SeV	69	48
	23	49

#### 産業上の利用の可能性

(一) 鎖RNAウイルスcDNAより効率よくウイルス粒子を再構成する系を確立し、「伝播力を有する特定の(一)鎖RNAウイルスに由来するRNAと、核酸を含まないウイルス構造体とを含む複合体で、細胞感染能とRNA自律複製能とを有するが伝播力を欠如するもの」を製造し増幅する方法等を開発した。該複合体は、細胞に感染したのち細胞内でのみ増殖するので、遺伝子治療等安全性の要求される分野で、特に有用である。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGCGGCCGCC GTACGGTGGC AATGAGTGAA GGAGAAGT

38

配列番号：2

配列の長さ：69

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTGCGGCCGC GATGAAC TTT CACCCTAAGT TTTT VTTACT ACGGCGTACG TCATCTTTTT 60

TCTCTCTGC 69

配列番号：3

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA



## 配列

AAGCGGCCGC CAAAGTTCAC GATGGAAGAC

30

配列番号：4

配列の長さ：69

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

TGCGGCCGCG ATGAACTTTC ACCCTAAGTT TTTCTTACTA CGGATTATTA CAATTGGAC 60

TTTCCGCCC 69

## 請求の範囲

1. 伝播力を有する特定の(一)鎖RNAウイルスに由来するRNAと、核酸を含まないウイルス構造体とを含む複合体で、細胞感染能とRNA自律複製能とを有するが伝播力を欠如する複合体。
2. 特定のRNAウイルスが非分節型(一)鎖RNAウイルスであることを特徴とする、請求の範囲1記載の複合体。
3. 特定のRNAウイルスがセンダイウイルスであることを特徴とする、請求の範囲1記載の複合体。
4. センダイウイルスRNAまたはセンダイウイルスcRNAを含むRNAで、M,F,HN 蛋白質に相当する遺伝子のうち少なくとも1つ以上の遺伝子が欠失 または不活化しているRNA。
5. 請求の範囲4記載のRNAと、センダイウイルス由来の核酸を含まないウイルス構造体とを含む複合体で、細胞感染能とRNA自律複製能とを有するが伝播力を欠如する複合体。
6. 請求の範囲4記載のRNAを試験管内または細胞内で転写することのできる鋳型DNAを含むDNA。
7. 複合体内に含まれるRNAが外来性遺伝子を含むことを特徴とする請求の範囲1～3または5のいずれかに記載の複合体。
8. 複合体内に含まれるRNAが外来性遺伝子を含むことを特徴とする請求の範囲3または5に記載の複合体。
9. 外来性遺伝子を含むことを特徴とする請求の範囲4に記載のRNA
10. 外来性遺伝子を含むことを特徴とする請求の範囲6に記載のDNA。
11. RNA依存性RNA複製を阻害する薬剤を含む、請求の範囲1～3、5、7または8のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAの複製阻害剤。
12. 請求の範囲1～3、5、7または8のいずれかに記載の複合体が伝播しう

る宿主。

13. 請求の範囲1～3、5、7または8のいずれかに記載の複合体の、感染能に関わる遺伝子群を染色体上に有し、該複合体を感染せしめたとき、該複合体と同一のものを複製しうることを特徴とする請求の範囲12に記載の宿主。

14. 宿主が動物、動物に由来する細胞、動物の組織または動物の卵であることを特徴とする請求の範囲12または13に記載の宿主。

15. 動物が哺乳類であることを特徴とする請求の範囲14に記載の宿主。

16. 動物が鳥類であることを特徴とする請求の範囲14に記載の宿主。

17. 請求の範囲3、5または8のいずれかに記載の複合体の、感染能に関わる遺伝子群を発現しており、該複合体を感染せしめたとき、該複合体と同一のものを複製しうることを特徴とする宿主。

18. センダイウイルスのM遺伝子、F遺伝子、HN遺伝子またはそれらと同等の機能を有する遺伝子のうち少なくとも1つ以上の遺伝子を染色体上に有する宿主。

19. センダイウイルスのM遺伝子または同等の機能を有する遺伝子を染色体上に有する宿主。

20. センダイウイルスのM遺伝子、NP遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子（各遺伝子は同等の機能を有する遺伝子で置換されていてもよい）を染色体上に有する宿主。

21. センダイウイルスのM遺伝子、F遺伝子およびHN遺伝子（各遺伝子は同等の機能を有する遺伝子で置換されていてもよい）を染色体上に有する宿主。

22. センダイウイルスのM遺伝子、F遺伝子、HN遺伝子、NP遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子（各遺伝子は同等の機能を有する遺伝子で置換されていてもよい）を染色体上に有する宿主。

23. 宿主が動物、動物に由来する細胞、動物の組織または動物の卵であることを特徴とする請求の範囲17～22のいずれかに記載の宿主。

24. 動物が哺乳類であることを特徴とする請求の範囲23に記載の宿主。

25. 動物が鳥類であることを特徴とする請求の範囲23に記載の宿主。

26. a)請求の範囲1～3、5、7または8のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを生合成しうるユニット

b)該RNAもしくは該cRNAの複製に必要な酵素群、または該酵素群を生合成しうるユニット

c)該複合体の、感染能に関わる蛋白質群、または該蛋白質群を生合成しうるユニット

の3者を含むキット。

27. a)請求の範囲1～3、5、7または8のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを生合成しうるユニット

b)該RNAもしくは該cRNAの複製に必要な酵素群、または該酵素群を生合成しうるユニット

c)請求の範囲12～25のいずれかに記載の宿主

の3者を含むキット。

28. a)請求の範囲1～3、5、7または8のいずれかに記載の複合体

b)請求の範囲12～25のいずれかに記載の宿主

の2者を含むキット。

29. a)請求の範囲3、5または8のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAもしくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを生合成しうるユニット

b)センダイウイルスのNP,P/C, L蛋白質のすべて、または該蛋白質群を生合成しうるユニット

c)該複合体の感染能に関わる蛋白質群、または該蛋白質群を生合成しうるユニット

の3者を含むキット。

30. a)請求の範囲3、5または8のいずれかに記載の複合体に含まれるRNAも

しくは該RNAのcRNA、または該RNAもしくは該cRNAを生合成しうるユニット

b) センダイウイルスのNP, P/C, L蛋白質のすべて、または該蛋白質群を生合成しうるユニット

c) 請求の範囲17～25のいずれかに記載の宿主の3者を含むキット。

31. a) 請求の範囲3、5または8のいずれかに記載の複合体

b) 請求の範囲17～25のいずれかに記載の宿主の2者を含むキット。

32. 宿主内に、請求の範囲26a), b) およびc) に記載の3者を導入することにより、請求の範囲1～3、5、7または8のいずれかに記載の複合体を製造する方法。

33. 請求の範囲27c) に記載の宿主内に、請求の範囲27a) およびb) に記載の両者を導入することにより、請求の範囲1～3、5、7または8のいずれかに記載の複合体を製造する方法。

34. 請求の範囲28a) に記載の複合体を、請求の範囲28b) に記載の宿主に感染させることにより、該複合体を増幅し製造する方法。

35. 宿主内に、請求の範囲29a), b) およびc) に記載の3者を導入することにより、請求の範囲3、5または8のいずれかに記載の複合体を製造する方法。

36. 請求の範囲30c) に記載の宿主に、請求の範囲30a) およびb) に記載の両者を導入することにより、請求の範囲3、5または8のいずれかに記載の複合体を製造する方法。

37. 請求の範囲31a) に記載の複合体を、請求の範囲31b) に記載の宿主に感染させることにより、該複合体を増幅し製造する方法。

38. Mに相当する遺伝子が欠失または不活化していることを特徴とする請求の範囲9に記載のRNA。

39. M, F, HN に相当する遺伝子がすべて欠失または不活化していることを特徴

とする請求の範囲 9 に記載の RNA。

40. a) 請求の範囲 38 に記載の RNA

b) 請求の範囲 20 に記載の宿主

c) 請求の範囲 19 に記載の宿主

の 3 者を含むキット。

41. 請求の範囲 40 a) に記載の RNA を、請求の範囲 40 b) に記載の宿主 に導入することにより得られる複合体を、請求の範囲 40 c) に記載の宿主に感染させて該複合体を増幅し製造する方法。

42. 請求の範囲 41 の方法により製造された複合体。

43. a) 請求の範囲 39 に記載の RNA

b) 請求の範囲 22 に記載の宿主

c) 請求の範囲 21 に記載の宿主

の 3 者を含むキット。

44. 請求の範囲 43 a) に記載の RNA を、請求の範囲 43 b) に記載の宿主 に導入することにより得られる複合体を、請求の範囲 43 c) に記載の宿主に感染させて該複合体を増幅し製造する方法。

45. 請求の範囲 44 の方法により製造された複合体。

46. RNA 依存性 RNA 複製を阻害する薬剤を含む、請求の範囲 42、45 のいずれかに記載の複合体に含まれる RNA の複製阻害剤。

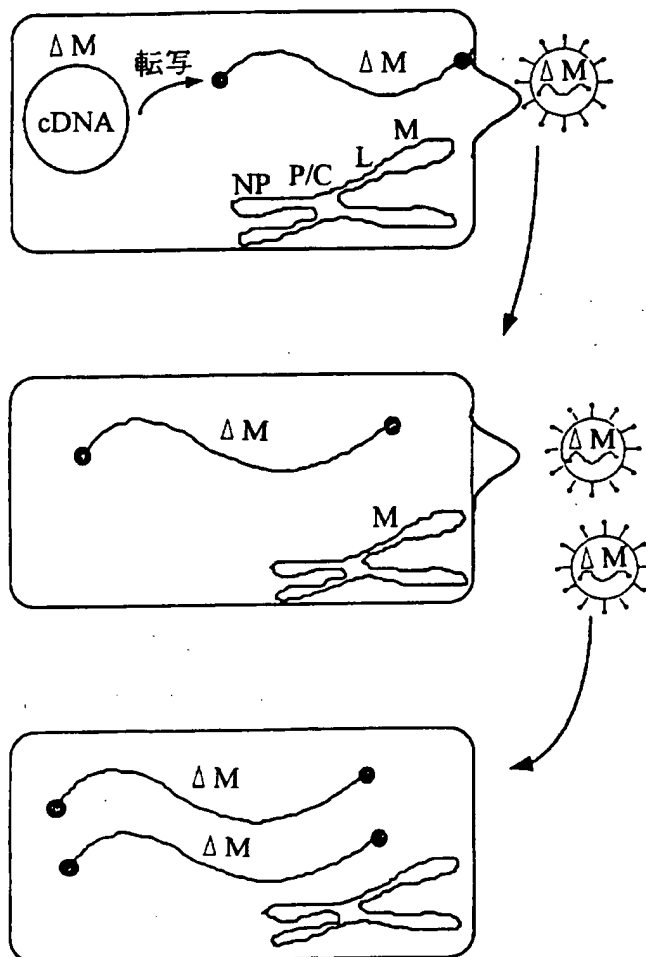
47. 請求の範囲 7 に記載の複合体を宿主に導入し、発現した外来性タンパク質を回収する工程を含む、外来性タンパク質の製造方法。

48. 宿主が、伝播力に関する遺伝子のうち、請求の範囲 7 に記載の複合体に含まれる RNA において欠如している遺伝子群を発現している細胞である、請求の範囲 47 に記載の外来性タンパク質の製造方法。

49. 請求の範囲 7 に記載の複合体を宿主に導入し、培養液または漿尿液を回収することによって取得しうる、発現した外来性タンパク質を含む培養液または漿尿

液。

図 1



A. NP, P/C, L そして、M を発現する細胞株をパッケージング細胞として用い、M 欠失型 cDNA からウイルス RNA を転写。最終的に 1 種類の  $\Delta M$  ウイルス粒子が産生される。

B. この  $\Delta M$  型ウイルスは、M 発現細胞でパッケージングされて粒子として回収できる。

C.  $\Delta M$  ウイルスを通常細胞に感染させる。ウイルス RNA は細胞中で複製をするが、粒子形成は起こらない。



2/4

図 2

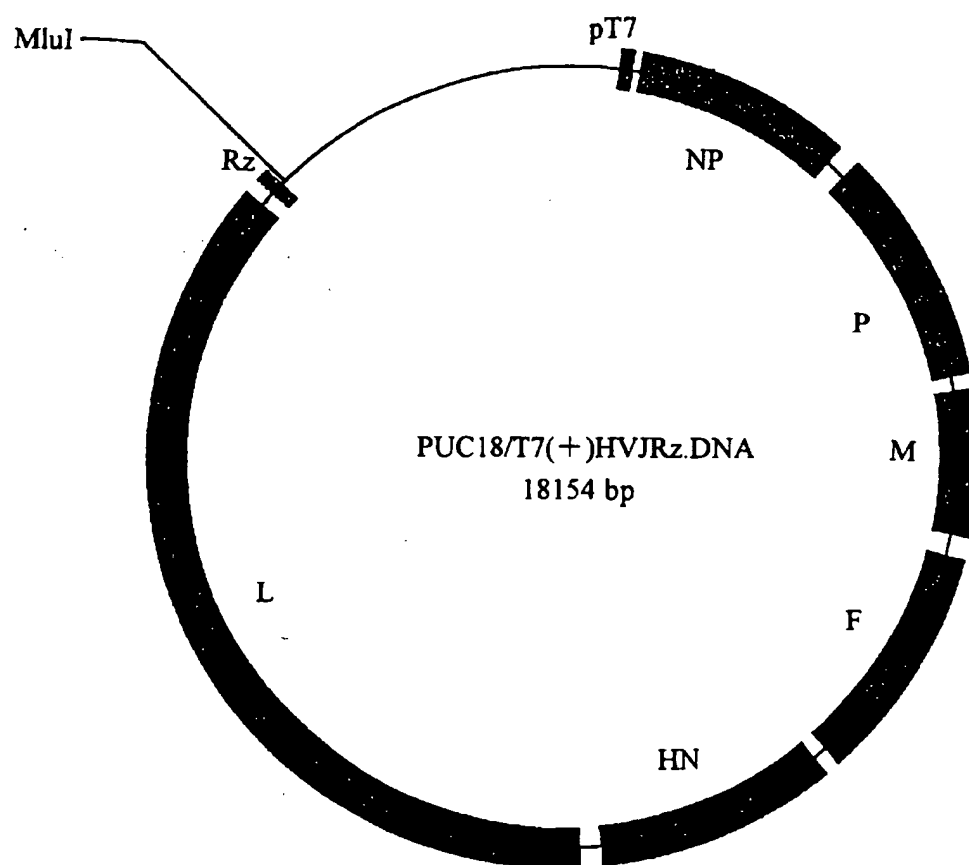


図 3

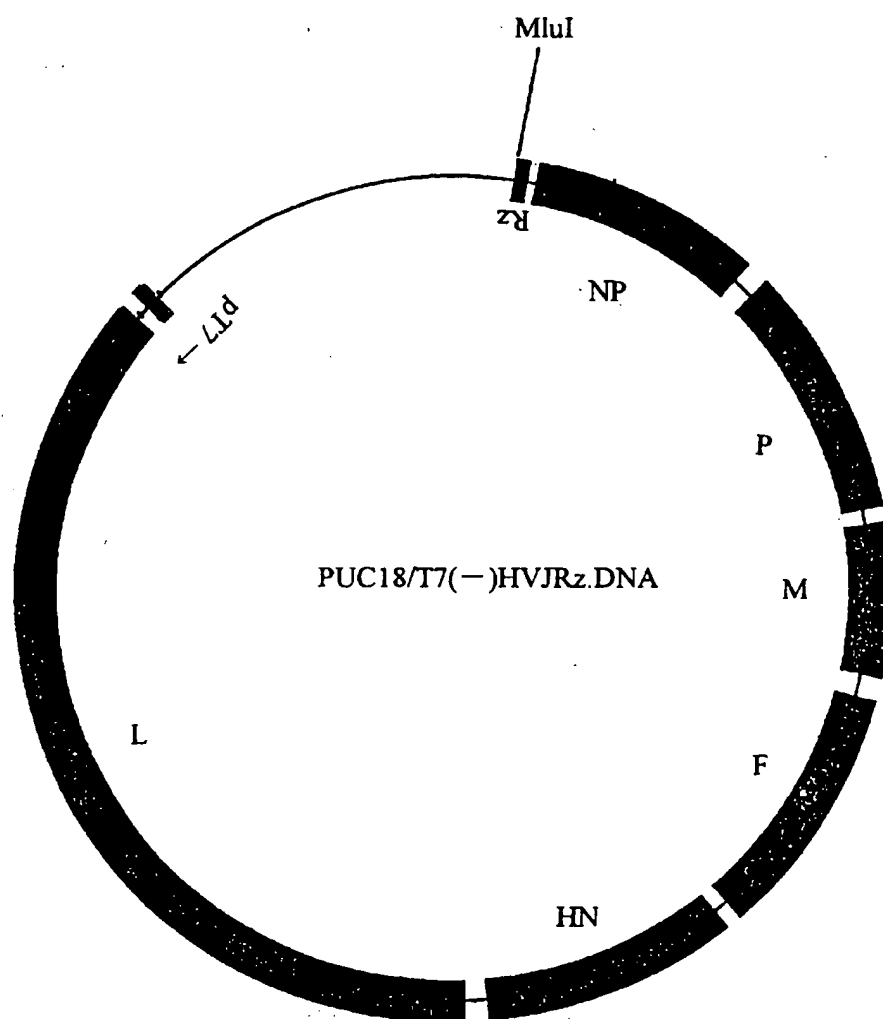
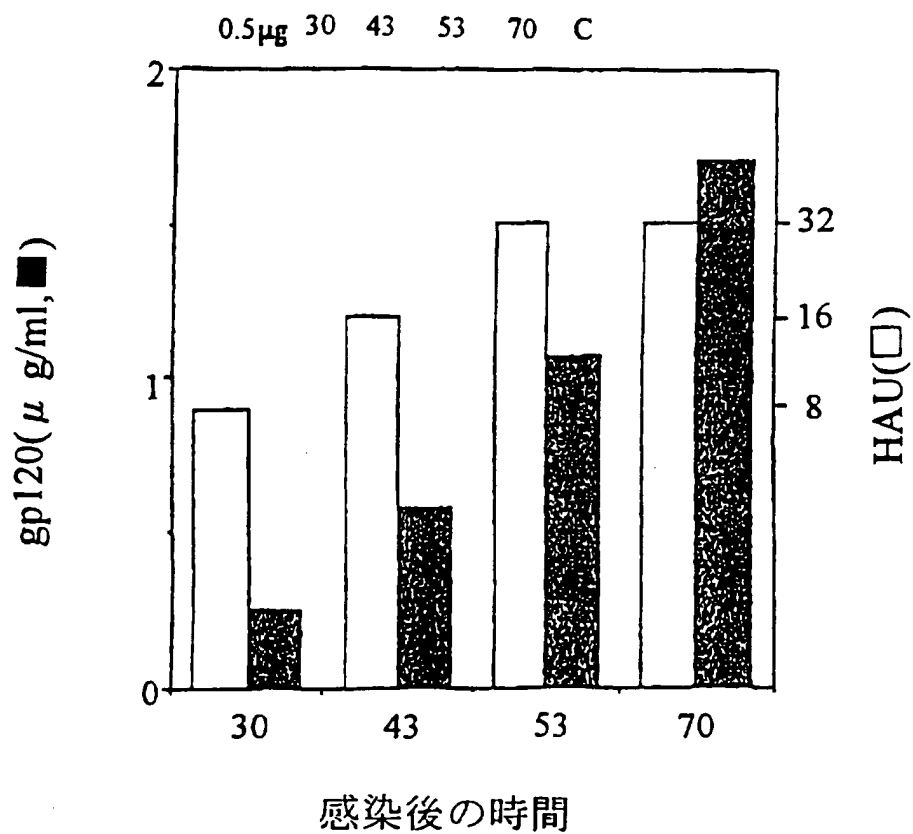


図 4



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03068

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N7/01, C12N15/45, C12N15/86, C12N5/10, C12N9/99,  
C12P21/02, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N7/01, C12N15/45, C12N15/86, C12N5/10, C12N9/99,  
C12P21/02, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSYS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Journal of Immunology, Vol. 126(3) (1981) Duane L. Peavy et al. "Inhibition of murine plaque-forming cell responses in vivo by rivavirin" p. 861-864	11, 46
X	Virology, Vol. 110(1981) Frank Malinoski et al. "Inhibitors of IMP Dehydrogenase Prevent Sindbis Virus Replication and Reduce GTP Levels in Aedes albopictus Cells" p. 281-291	11, 46
X	Journal of General Virology, Vol. 74(1993) Takemasa Sakaguti et al. "Expression of the HN, F, NP and M proteins of Sendai virus by recombinant vaccinia viruses and their contribution to protective immunity against Sendai virus infections in mice" p. 479-484 (Refer to Fig. 1 LLCMK2 Cell)	12, 14-15
A	Journal of Virology, Vol. 67(8) (1993) Philippe Calain et al. "The Rule of Six, a Basic Feature for Efficient Replication of Sendai Virus	1 - 49



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 14, 1997 (14. 01. 97)

Date of mailing of the international search report

January 28, 1997 (28. 01. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03068

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Defective Interfering RNA" p. 4822-4830	
A	Journal of Virology, Vol. 68(12)(1994) W. Willenbrink et al. "Long-Term Replication of Sendai Virus Defective Interfering Particle Nucleocapsids in Stable Helper Cell Lines" p. 8413-8417	1 - 49
A	Annu. Rev. Microbiol., Vol. 47(1993) Adolfo Garcia-Sastre et al. "Genetic Manipulation of Negative-Strand RNA Virus Genomes" p. 765-790	1 - 49
A	Journal of Virology, Vol. 66(12)(1992) K.H. Park et al. "In Vivo Model for Pseudo-Templated Transcription in Sendai Virus" p. 7033-7039	1 - 49
A	Cell, Vol. 59(1989) Willem Luytjes et al. "Amplification, Expression, and Packaging of a Foreign Gene by Influenza Virus" p. 1107-1113	1 - 49
A	JP, 4-211377, A (Schweiz Serum & Imp), August 3, 1992 (03. 08. 92) & EP, 440219, A & CA, 2035386, A & AU, 9170074, A	1 - 49

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/03068

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

IntCl<sup>1</sup> C12N7/01, C12N15/45, C12N15/86, C12N5/10, C12N9/99  
C12P21/02, A61K48/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

IntCl<sup>1</sup> C12N7/01, C12N15/45, C12N15/86, C12N5/10, C12N9/99  
C12P21/02, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSYS, MEDLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Journal of Immunology, Vol. 126[3](1981) Duane L. Peavy <i>et al.</i> 「Inhibition of murine plaque-forming cell responses <i>in vivo</i> by rivavirin」 p. 861-864	11, 46
X	Virology, Vol. 110(1981) Frank Malinoski <i>et al.</i> 「Inhibitors of IMP Dehydrogenase Prevent Sindbis Virus Replication and Reduce GTP Levels in <i>Aedes albopictus</i> Cells」 p. 281-291	11, 46
X	Journal of General Virology, Vol. 74(1993) Takemasa Sakaguti <i>et al.</i> 「Expression of the HN, F, NP and M proteins of Sendai virus by recombinant vaccina viruses and their contribution to protective immunity against Sendai virus infections in mice」 p. 479-484 (Fig. 1 LLCMK2 Cellを参照)	12, 14-15

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 01. 97

国際調査報告の発送日

28.01.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鷗 飼 健

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Journal of Virology, Vol. 67[8] (1993) Philippe Calain <i>et al.</i> 「The Rule of Six, a Basic Feature for Efficient Replication of Sendai Virus Defective Interfering RNA」 p. 4822-4830	1-49
A	Journal of Virology, Vol. 68[12] (1994) W. Willenbrink <i>et al.</i> 「Long-Term Replication of Sendai Virus Defective Interfering Particle Nucleocapsids in Stable Helper Cell Lines」 p. 8413-8417	1-49
A	Annu. Rev. Microbiol., Vol. 47 (1993) Adolfo Garcia-Sastre <i>et al.</i> 「Genetic Manipulation of Negative-Strand RNA Virus Genomes」 p. 765-790	1-49
A	Journal of Virology, Vol. 66[12] (1992) K. H. Park <i>et al.</i> 「In Vivo Model for Pseudo-Templated Transcription in Sendai Virus」 p. 7033-7039	1-49
A	Cell, Vol. 59 (1989) Willem Luytjes <i>et al.</i> 「Amplification, Expression, and Packaging of a Foreign Gene by Influenza Virus」 p. 1107-1113	1-49
A	J P, 4-211377, A (Schweiz Serum & Imp) 3. 8月. 1992 (03. 08. 92) & EP, 440219, A & CA, 2035386, A & AU, 9170074, A	1-49

## NEGATIVE STRAND RNA VIRAL VECTOR HAVING AUTONOMOUS REPLICATION CAPABILITY

### Field of the Invention

The present invention relates to a viral vector for the gene therapy. More specifically, this invention relates to a negative strand RNA viral vector.

### Background of the Invention

As to the gene therapy for humans and animals, therapeutic effectiveness and safety are very important factors. Especially, therapy performed by using "viral vector" expressing a foreign gene of concern which is obtained by gene recombination of the viral genome and the foreign gene needs to be very cautiously carried out, when such undeniable possibilities exist as that the recombinant virus may be inserted to unspecified sites of chromosomal DNA, that the recombinant virus and pathogenic virus may be released to the natural environment, and that the expression level of gene transfected into cells cannot be controlled, or the like, even though its therapeutic effectiveness is recognized.

These days, a great number of gene therapies using recombinant viruses are performed, and many clinical protocols of gene therapy are proposed. Characteristics of these recombinant viral vectors largely depend on those of the viruses from which said vectors are derived.

The basic principle of viral vector is a method for transferring the desired gene into targeted cells by utilizing the viral infectivity. By "infectivity" in this specification is meant the "capability of a virus to transfer its nucleic acid, etc. into cells through its adhesiveness to cells and penetrating capability into cells via various mechanisms including fusion of the viral membrane and host cellular membrane". With the surface of recombinant viral vectors genetically manipulated to insert a desired gene are associated the nucleocapsid and envelope proteins, etc. which are derived from the parental virus and confer infectivity on the recombinant virus. These proteins enable the transfer of the enclosed recombinant gene into cells. Such recombinant viral vectors can be used for the purpose of not only gene therapy, but also production of cells expressing a desired gene as well as transgenic animals.

Viral vectors are classified into three classes comprising the retroviral vector, DNA viral vector and RNA viral vector.

These days, the vectors most frequently used in gene therapy are retroviral vectors derived from retroviruses. Retroviruses replicate through the following processes. First, upon penetration into cells, they generate complementary DNAs (cDNAs) using their own reverse transcriptase as at least part of catalysts and their own RNA templates. After several steps, said cDNAs are incorporated into host chromosomal DNAs, becoming the proviruses. Proviruses are transcribed by the DNA-dependent RNA polymerase derived from the host, generating viral RNAs, which is packaged by the gene products (proteins) translated from the RNAs. The RNAs and proteins finally assemble to form mature virus particles.

In general, retroviral vectors used in gene therapy, etc. are capable of



carrying out processes up to provirus generation. However, they are deficient viruses deprived of genes necessary for their packaging of the progeny genome RNA so that they do not form viral particles from provirus. Retroviruses are exemplified by, for example, mouse leukemia virus, feline leukemia virus, baboon type C oncovirus, human immunodeficiency virus, adult T cell leukemia virus, etc. Furthermore, recombinant retroviral vectors hitherto reported include those derived from mouse leukemia virus [see *Virology*, 65, 1202 (1991), *Biotechniques*, 9, 980 (1989), *Nucleic Acids Research*, 18, 3587 (1990), *Molecular and Cellular Biology*, 7, 887 (1987), *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, 90, 3539 (1993), *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, 86, 3519 (1989), etc.] and those derived from human immunodeficiency virus [see *Journal of Clinical Investigation*, 88, 1043 (1991)], etc.

Retroviral vectors are produced aiming at efficiently inserting a desired specific DNA into the cellular chromosomal DNA. However, since the insertion position of the DNA is unpredictable, there is undeniable possibilities such as the damage of normal genes, activation of oncogene and excessive or suppressive expression of desired gene, depending the position of insertion. In order to solve these problems, a transient expression system using DNA viral vectors which can be used as extrachromosomal genes has been developed.

DNA viral vectors are derived from DNA viruses, having DNA as genetic information within viral particles. Replication of said DNA is carried out by repeating the process of generating complementary DNA strand using DNA-dependent DNA replicase derived from host as at least one of catalysts with its own DNA as template. The actual gene therapy using adenoviral vector, a DNA viral vector usable as extrachromosomal gene, is exemplified by the article in [*Nature Genetics*, 3, 1-2 (1993)]. However, since, in the case of DNA viral vectors, the occurrence of their undesirable recombination with chromosomal DNA within nucleus is also highly possible, they should be very carefully applied as vectors for gene therapy.

Recently, RNA viral vectors based on RNA viruses have been developed as conceivably more safer vectors than DNA and retroviral vectors described above. RNA viruses replicate by repeating the processes for generating complementary strands using their own RNA-dependent RNA replicase as the catalyst with their own RNA as template.

The genome RNA of positive strand RNA viruses have dual functions as the messenger RNA (hereafter simply called mRNA), which generate proteins, depending on the translational functions of host cells, necessary for the replication and viral particle formation and as the template for genome replication. In other words, the genome RNA itself of positive strand RNA viruses has a disseminative capability. In the present specification, by "disseminative capability" is meant "the capability to form infectious particles or their equivalent complexes and disseminate them to other cells following the transfer of nucleic acid into host cells by infection or artificial techniques and the intracellular replication of said nucleic acid". Sindbis virus classified to positive strand RNA viruses and Sendai virus classified to negative strand RNA viruses have both infectivity and disseminative

capability. Adeno-satellite virus classified in Parboviruses is infectious but not disseminative (mixed infection with adenovirus is required for the formation of viral particles.). Furthermore, the positive strand RNA derived from Sindbis virus which is artificially transcribed *in vitro* is disseminative (forming infectious viral particles when transfected into cells), but neither positive nor negative RNA strands of Sendai virus artificially transcribed *in vitro* is disseminative, generating no infectious viral particles when transfected into cells.

In view of the advantage that the genome RNA functions as mRNA at the same time, the development of RNA viral vectors derived from positive strand RNA viruses preceded [see Bio/Technology, 11, 916-920 (1993), Nucleic Acids Research, 23, 1495-1501 (1995), Human Gene Therapy, 6, 1161-1167 (1995), Methods in Cell Biology, 43, 43-53 (1994), Methods in Cell Biology, 43, 55-78 (1994)]. For example, RNA viral vectors derived from Semliki forest virus (SFV) [Bio/Technology, 11, 916-920 (1993)] and Sindbis virus are basically of the RNA structure wherein the structural protein gene regions related to the viral structure are deleted, and a group of genes encoding proteins necessary for viral transcription and replication are retained with a desired foreign gene being linked downstream of the transcription promotor. Direct transfer of such recombinant RNA or cDNA which can transcribe said RNA [Nucleic Acids Research, 23, 1495-1501 (1995)] into cells by microinjection, etc. allows autonomous replication of RNA vectors containing the foreign gene, and the transcription of foreign gene inserted downstream of the transcription promotor, resulting in the expression of the desired products from the foreign gene within cells. Furthermore, the present inventors succeeded in forming an infectious but not disseminative complex by the co-presence of cDNA unit (helper) for expressing the viral structural gene and that for expressing said RNA vector in the packaging cells.

Positive strand RNA viral vectors are expected to be useful as RNA vectors with autonomous replicating capability, but their use as vectors for gene therapy poses the following problems.

1. Since they are of the icosohedral structure, the size of foreign gene allowed to be inserted is limited to 3,700 nucleotides at most.

2. Until nucleic acids are released from the packaged complex into the cell and replicated, as many as five processes are required, including cellular adhesion, endocytosis, membrane fusion, decapsidation and translation of replication enzymes.

3. A possible formation of disseminative viral particles even in a minute quantity during packaging cannot be denied. Especially, even with attenuated viral particles, the inside RNA itself has disseminative potency and may belatedly be amplified, making it difficult to check.

4. Since these vectors are derived from viruses transmitted to animals by insects such as mosquitoes, when animals and humans to which such vector genes are transferred and are mix-infected with wild type viruses, disseminative recombinants may be formed, possibly further creating a risk of said recombinants being scattered to the natural environment by insects.

Such problems described above are conceived to be basically overcome if RNA viral vectors derived from negative strand RNA viruses are constructed. That is, since negative strand RNA viruses do not have the capsid of icosahedral structure but have a helical nucleocapsid, and also since the envelope size of particles is known to vary depending on the inside RNA content, they are supposed to be much less restricted, compared with positive strand RNA viruses, with respect to the size of foreign genes to be inserted when used as RNA viral vectors. Further, since a group of proteins required for transcription and replication are packaged into particles, only two processes are required, including cellular adhesion and membrane fusion, until nucleic acids are replicated. Furthermore, viral RNA alone is not disseminative. In addition, most of negative strand RNA viruses are not transmitted by insects.

In spite of many advantages of negative strand RNA viruses which may be used as the source of industrially useful viral vectors, no negative strand RNA vectors applicable for gene therapy has become available until now. This is probably due to tremendous difficulties in re-constituting viral particles via viral cDNA. Since the gene manipulation on the DNA level is required to insert foreign genes into vectors, so far as viral particles are not reconstructed from viral cDNA with a foreign gene inserted, it is difficult to use negative strand RNA viruses as a vector. "Reconstruction of viral particles" refers to the formation of the original virus or a recombinant virus *in vitro* or intracellularly from artificially prepared cDNA encoding the viral RNA genome.

As described above, it has been clearly demonstrated that, even if the viral RNA (vRNA) of negative strand RNA viruses or its complementary strand RNA (cRNA; complementary RNA) alone is transferred into cells, no progeny virus can be generated. This is a definitely different point from the case of positive strand RNA viruses, whose RNA can initiate viral life cycle and generate progeny viruses, when transferred into cells. Although, in JP-A-Hei 4-211377, "methods for preparing cDNA corresponding to a nonsegmented negative strand RNA viral genome and infectious negative strand RNA virus" are described for measles virus, a paramyxovirus, the entire experiments of said document described in "EMBO. J., 9, 379-384 (1990)" were later proved to be not reproducible, so that the authors themselves had to withdraw all the article contents [ref. EMBO. J., 10, 3558 (1991)]. Therefore, it is obvious that techniques described in JP-A-Hei 4-211377 for another paramyxovirus, Sendai virus, do not correspond to the related art of the present invention.

With regard to the reconstitution system for negative strand RNA viruses, there are reports on influenza virus [Annu. Rev. Microbiol., 47, 765-790 (1993); Curr. Opin. Genet. Dev., 2, 77-81 (1992)]. Influenza virus is an eight-segmented negative strand RNA virus. According to these literatures, a foreign gene was first inserted to a cDNA corresponding to one of said segments, and the RNA transcribed from the cDNAs is assembled with the virus-derived NP protein and RNA polymerase proteins to form an RNP. Then, cells are transfected with this RNP and superinfected with an appropriate intact influenza virus. A reassortant virus emerges, in which the corresponding segment is replaced with the engineered segment, which can be selected under appropriate pressures. Several

years later, virus-reconstitution entirely from cDNA of nonsegmented negative strand RNA virus was reported with rabies virus belonging to rhabdoviruses [EMBO J. 13, 4195-4202 (1994)].

However, it has been difficult to use these virus reconstitution techniques as such for constructing vectors for gene therapy because of the following problems.

1. Reconstituted viruses were identified only by the expression of marker gene, RT-PCR, etc. No reconstitution system for the production of vector viruses in a satisfactory yield has been established.

2. Differing from the case of positive strand RNA viruses, in order to form complexes with infectivity but deficient in disseminative potency as vectors for gene therapy, it is necessary to enclose factors required for primary transcription and replication within the complex. No technique for amplifying these complexes in a large scale has been established.

3. For the purpose of intracellularly providing factors necessary for viral reconstitution, cells to which cDNAs are introduced are mix-infected with helper viruses such as recombinant vaccinia virus, etc. to allow transcription of the plasmids supplying those viral protein factors in trans. It is not easy to separate these natural type viruses from the reconstituted viruses.

Furthermore, as one problem with regard to RNA viral vectors in general, it is conceivably necessary to beforehand provide inhibitors for replication of RNA viral vectors which have no effects on host's replication and transcription, providing for the case where RNA replicated and transcribed in large amounts exerts undesirable effects on treated humans and animals. However, no such inhibitors have been developed.

#### Summary of the Invention

Objects of the present invention are to develop negative strand RNA viral vectors for practical use, methods for efficiently preparing said vectors, and inhibitors for the replication of said vectors.

The present inventors first attempted to reconstitute Sendai virus from nucleic acids of said virus which is a typical nonsegmented, negative strand RNA virus, and conceived to be industrially most useful as a vector from the viewpoints of safety and convenience. First, in order to apply to the reconstitution test, various investigations were performed using cDNA encoding a Sendai virus minigenome as experimental materials. A cDNA plasmid was constructed so that the Sendai virus protein coding region of about 14 kb is replaced with a reporter luciferase gene and this construct is flanked by T7 promoter and hepatitis delta virus ribozyme gene. As a result, the inventors found efficient conditions regarding weight ratios among materials to be transferred into host cells, including minigenome cDNA, cDNAs encoding the nucleocapsid protein (N), the large protein (L), and the phosphoprotein (P), and minimizing cytotoxicity induced by the recombinant vaccinia virus to provide the T7RNA polymerase. The N protein encapsidate the naked viral RNA to form the RNP, which is now active as the template for both viral mRNA synthesis and viral replication. Furthermore, the present inventors obtained full-length cDNAs corresponding to both positive and

negative strands, constructed plasmids for inducing the intracellular biosynthesis of either positive strand RNA (antigenome or cRNA) or negative strand RNA (genome or vRNA) of Sendai virus, and transferred said plasmids into host cells wherein N, P, and L proteins from the respective cotransfected plasmids were expressed. As a result, the inventors first succeeded in re-constructing Sendai virus particles from cDNAs derived thereof.

That is, the present invention comprises the followings.

1. A complex comprising an RNA molecule derived from a specific disseminative negative strand RNA virus and viral structural components containing no nucleic acids, having the infectivity and autonomous RNA replicating capability, but deficient in the disseminative capability.
2. The complex of description 1, wherein said specific RNA virus is a negative strand RNA virus having non-segmented genome.
3. The complex of description 2, wherein said specific RNA virus is Sendai virus.
4. An RNA molecule comprising Sendai viral RNA (vRNA) or its complementary RNA (cRNA), wherein said RNA molecule is defective in that at least one or more than one gene coding for each of the M, F and HN proteins are deleted or inactivated.
5. A complex comprising the RNA of description 4 and viral structural components containing no nucleic acids derived from Sendai virus, having the infectivity and autonomous RNA replicating capability, but deficient in the disseminative capability.
6. A DNA molecule comprising a template DNA transcribable to the RNA molecule of description 4 *in vitro* or intracellularly.
7. The complex of any one of descriptions 1-3 or 5, wherein the RNA molecule contained in said complex comprises a foreign gene.
8. The complex of descriptions 3 or 5, wherein the RNA molecule contained in said complex comprises a foreign gene.
9. The RNA molecule of description 4 comprising a foreign gene.
10. The DNA molecule of description 6 comprising a foreign gene.
11. An inhibitor for RNA replication contained in the complex of any one of descriptions 1-3, 5, 7 or 8 comprising an inhibitory drug for the RNA-dependent RNA replication.
12. A host whereto the complex of any one of descriptions 1-3, 5, 7 or 8 can disseminate.
13. The host of description 12 comprising a group of genes related to the infectivity of the complex of any one of descriptions 1-3, 5, 7 or 8 on its chromosomes, and capable of replicating the same copies of said complex when infected with it.
14. The host of descriptions 12 or 13, wherein said host is animals, or cells,

tissues, or embryonated eggs derived from it.

15. The host of description 14 wherein said animal is mammalian.

16. The host of description 14 wherein said animal is avian.

17. A host comprising a group of genes related to the infectivity of the complex of any one of descriptions 3, 5 or 8 on its chromosomes, and capable of replicating the same copies of said complex when infected with it.

18. A host comprising at least more than one gene of the M, F and HN genes of Sendai virus or genes having functions equivalent to them on its chromosomes.

19. A host comprising the M, F, or HN gene of Sendai virus or each of their functionally equivalent genes on its chromosomes.

20. A host comprising the M, NP, P and L genes of Sendai virus on its chromosomes (wherein each gene may be substituted with its functionally equivalent gene, respectively).

21. A host comprising the M, F and HN genes of Sendai virus on its chromosomes (wherein each gene may be substituted with its functionally equivalent gene, respectively).

22. A host comprising the M, F, HN, NP, P and L genes of Sendai virus on its chromosomes (wherein each gene may be substituted with its functionally equivalent gene, respectively).

23. The host of any one of descriptions 17-22, wherein said host is animal, or cell, tissue or egg derived from it.

24. The host of description 23, wherein said animal is mammalian.

25. The host of description 23, wherein said animal is avian.

26. A kit consisting of the following three components,

a. the RNA molecule contained in the complex of any one of descriptions 1-3, 5, 7 or 8, or cRNA of said RNA, or a unit capable of biosynthesizing said RNA or said cRNA,

b. a group of enzymes required for replicating said RNA or said cRNA, or a unit capable of biosynthesizing said group of enzymes, and

c. a group of proteins related to the infectivity of said complex, or a unit for biosynthesizing said group of proteins.

27. A kit consisting of the following three components,

a. the RNA molecule contained in the complex of any one of descriptions 1-3, 5, 7 or 8, or cRNA of said RNA, or a unit capable of biosynthesizing said RNA or said cRNA,

b. a group of enzymes required for replicating said RNA or said cRNA, or a unit capable of biosynthesizing said group of enzymes, and

c. the host of any one of descriptions 12-25.

28. A kit consisting of the following two components,

- a. the complex of any one of descriptions 1-3, 5, 7 or 8, and
  - b. the host of any one of descriptions 12-25.
29. A kit consisting of the following three components,
- a. the RNA molecule contained in the complex of any one of descriptions 3, 5 or 8, or cRNA of said RNA, or a unit capable of biosynthesizing said RNA or said cRNA,
  - b. all NP, P and L proteins of Sendai virus, or a unit for biosynthesizing said group of proteins, and
  - c. a group of proteins related to the infectivity of said complex, or a unit for biosynthesizing said group of proteins.
30. A kit consisting of the following three components,
- a. the RNA molecule contained in the complex of any one of descriptions 3, 5 or 8, cRNA of said RNA, or a unit capable of biosynthesizing said RNA or said cRNA,
  - b. all NP, P and L proteins of Sendai virus, or a unit capable of biosynthesizing said group of proteins, and
  - c. the host of any one of descriptions 17-25.
31. A kit consisting of the following two components,
- a. the complex of any one of descriptions 3, 5 or 8, and
  - b. the host of any one of descriptions 17-25.
32. A method for producing the complex of any one of descriptions 1-3, 5, 7 or 8 by introducing three components of descriptions 26a, 26b and 26c into a host.
33. A method for producing the complex of any one of descriptions 1-3, 5, 7 or 8 by introducing both components of descriptions 27a and 27b into the host of description 27c.
34. A method for amplifying and producing the complex of description 28a by transfecting said complex to the host of description 28b.
35. A method for producing the complex of any one of descriptions 3, 5 or 8 by introducing the three components of descriptions 29a, 29b and 29c into a host.
36. A method for producing the complex of any one of descriptions 3, 5 or 8 by introducing both components of descriptions 30a and 30b into the host of description 30c.
37. A method for amplifying and producing the complex of description 31a by transfecting said complex into the host of description 31b.
38. The RNA molecule of description 9 wherein a gene corresponding to the M, F, or HN gene is deleted or inactivated.
39. The RNA molecule of description 9 wherein all the genes corresponding to the M, F and HN genes are deleted or inactivated.

40. A kit consisting of the following three components,
- a. the RNA molecule of description 38,
  - b. the host of description 20, and
  - c. the host of description 19.
41. A method for producing a complex by introducing the RNA molecule of description 40a into the host of description 40b, and amplifying and producing said complex by transfecting it into the host of description 40c.
42. A complex produced by the method of description 41.
43. A kit consisting of the following three components,
- a. the RNA molecule of description 39,
  - b. the host of description 22, and
  - c. the host of description 21.
44. A method for producing a complex by introducing the RNA molecule of description 43a into the host of description 43b, and amplifying and producing said complex by transfecting it into the host of description 43c.
45. A complex produced by the method of description 44.
46. An inhibitor for RNA replication contained in the complex of either descriptions 42 or 45 comprising an inhibitory drug of the RNA-dependent RNA replication.
47. A method for preparing the foreign proteins, wherein said method comprises the process of introducing the complex of description 7 to a host and the process of recovering the expressed foreign proteins.
48. A method for preparing the foreign proteins of description 47, wherein the host is a cell expressing a group of genes, from among those related to the disseminative capability, which are deficient in the RNA molecule contained in the complex of description 7.
49. A culture medium or allantoic fluid containing the expressed foreign proteins, wherein said culture medium or allantoic fluid is obtained by inoculating the complex of description 7 into a host and recovering it.

#### Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a schematic representation of a process for generating complexes of the present invention from cDNA deficient in the M gene of Sendai virus (step A) amplifying said complexes in an M-expressing cell (step B), and replication of said complexes in a normal cell (step C).

Figure 2 is a schematic representation of the construction of a pUC18/T7(+ )HVJRz.DNA.

Figure 3 is a schematic representation of the construction of a pUC18/T7(- )HVJRz.DNA.

Figure 4 is a graphical representation showing the relationship between the time after the infection of SeVgp120 into CV-1 cells and levels of HAU and gp120



expression.

#### Detailed Description of the Invention

Any negative strand RNA viruses with disseminative capability may be used as materials in the present invention. Although incomplete viruses such as defective interfering particles (DI particles) and synthetic oligonucleotide may also be used as partial materials, in general, they must have the base sequence equivalent to that of the virus with disseminative capability. Negative strand RNA viruses of the present invention include, for example, Sendai virus, Newcastle disease virus, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus, rinderpest virus of cattle and canine distemper virus of Paramyxoviridae, influenza virus of Orthomyxoviridae, vesicular stomatitis virus and rabies virus of Rhabdoviridae.

As the negative strand viral material, recombinant negative strand viruses derived from any viruses described above and retaining the disseminative capability may be used. For example, the recombinant negative strand virus may be the one with the gene for the immunogenicity inactivated or a partial region of gene altered to enhance the efficiency of RNA transcription and replication.

RNAs contained in the RNA-protein complex of the present invention can be obtained by transcribing modified cDNAs derived from any viruses or recombinant viruses described above *in vitro* or intracellularly. In RNAs thus obtained, at least one gene related to the disseminative capability of the original virus must be deleted or inactivated, but the gene related to the autonomous replication should not. In addition, RNA molecules with artificial sequences, which are obtained by transcribing, *in vitro* or intracellularly, DNA formed by inserting the genes for the autonomous replication into cDNA having both terminus structures of the virus genome may be also used.

As described above, in the case of Sendai virus, "the genes related to autonomous replication" refer to the NP, P and L genes, and "the gene related to the disseminative capability" refers to any one of the M, F and HN genes. Therefore, the RNA molecule of Sendai virus Z strain deficient only in the M gene, for example, is suitable as a component contained in the "complex" of the present invention. Also, the RNA molecule having all the M, F and HN genes deleted or inactivated are also preferable as the component contained in the "complex" of the present invention. On the other hand, it is necessary for the genes encoding the NP, P and L proteins to be expressed from RNA. However, the sequences of these genes are not necessarily the same as those of virus, and may be modified by introducing variations, or replacing by the corresponding gene derived from other viruses, so far as the transcription and replication activity of the resulting RNA is similar to or higher than that of the natural one.

"Virus structural component free of nucleic acid" of the present invention includes, for example, virus with only its RNA removed. As such structural component is used the one which complements the infectivity and autonomous replicating capability at the early stage, but not the disseminative capability. In the case of Sendai virus, the complex composed of its RNA with only the M gene deleted, and Sendai virus having only its RNA deleted have the infectivity and autonomous replicating capability, but no disseminative capability. Complex may

contain other components so long as it is provided with no disseminative capability. For example, complex may contain adhering molecule, ligand, receptors, etc. on its envelope surface for facilitating the adherence to specific cells.

The RNA molecule contained in the complex can have an inserted foreign gene at its appropriate site. In order to express a desired protein, the foreign gene encoding said protein is inserted. In the case of Sendai viral RNA, a sequence of bases of 6 multiplication in number is preferably inserted between sequences R1 (5'-AGGGTCAAAGT-3') and R2 (5'-GTAAGAAAAA-3') [Journal of Virology, Vol. 67, No. 8 (1993), p.4822-4830]. Levels of expression of the foreign gene inserted into RNA can be regulated by virtue of the site of gene insertion and the base sequence flanking the inserted foreign gene. For example, in the case of Sendai viral RNA, it is thought that there are increasing levels of expression of the inserted gene with decreasing distance of said gene from the 3' terminal promoter, whose length has not been precisely defined yet. Preferred host cells for the introduction of the complex to express in high quantities desired proteins are those expressing genes deleted in the RNA molecule composed of said complex. For this, transgenic avian eggs expressing said genes are most preferable for preparing proteins in large quantities because said genes complement the defects of the virus, facilitating the virus production and thus yielding the inserted gene product in high quantities in the allantoic fluid. Also, proteins thus expressed can be recovered from the culture medium when the avian cells are cultured *in vitro*. In Examples 5 and 6 is used a disseminative complex in place of non-disseminative complex of the present invention. However, it will be clear to those skilled in the art that similar results are obtained with the complex of the present invention as with the disseminative complex in these examples when "cells expressing genes deleted from among genes for disseminative capability in the RNA molecule contained in the complex" are used as host cells.

The present inventors have confirmed that, for the efficient reconstitution of Sendai virus particles, cDNA to be introduced into cells must be in the circular form rather than in the linear form, and, for viral particle formation at a high efficiency, the transcription of the positive strand RNA is preferred to that of the negative strand RNA within cells. Although these conditions may not necessarily be applicable to the reconstitution of all other negative strand RNA viruses, it is possible to search for appropriate conditions for the reconstitution of other negative strand RNA viruses based on the disclosure of the present invention and conventional technology, indicating a possibility for establishing techniques to produce basic materials of desired negative strand viral vectors, that is, the viral reconstitution systems.

Sendai virus reconstitution can be initiated following transfection with full-length viral RNA, either negative or positive sense, that has been synthesized *in vitro* from the cDNAs. This indicates that, if cells which express all viral proteins (N, P, and L) required for initial transcription, replication, and encapsidation are constituted, the recombinant Sendai virus, eventually complexes described above can be formed entirely without using helper viruses such as vaccinia virus. Since cells which express all the three viral proteins required for initial transcription, replication, and encapsidation were already described [J. Virology, 68, 8413-8417

(1994)], those skilled in the art may form such complementing cells. The cell type described in said reference are the one derived from the 293 cell line which carries three of Sendai virus genes, namely NP, P, and L, on its chromosome, expressing proteins encoded by the three genes, NP, P, and L.

From numerous examples of viral vectors, if viral particles can be efficiently reconstructed from nucleic acids, it is obvious that those skilled in the art are able to readily exchange a desired viral gene, insert a foreign gene, or inactivate or delete a desired gene. For example, an article on the use of DI (defective interfering) particles [J. Virol., 68, 8413-8417 (1994)] clearly indicates that, when Sendai virus RNA devoid of most of the protein-coding region but intact in its promoter sequences at both termini can be replicated in cells, if group of enzymes (L and P proteins) necessary for transcription and replication and the structural protein N to encapsidate the viral RNA are provided simultaneously in the cells. Therefore, once an RNA molecule containing a foreign gene transcribed from "specific viral cDNA deficient in at least a part of structural genes but normal in genes coding for N, P, and L, begins to be replicated by N, P, and L coexpressed by the cotransfected plasmid cDNAs, a virus particle will be formed, which is infectious to and autonomously replicating in a new cell, but deficient in the disseminative potency, and can express the foreign gene. Such complexes are extremely useful as a vector for gene therapy. That is, in the present invention, with a negative strand RNA virus, it becomes possible to prepare complexes which are infectious as well as autonomously replicative to express a foreign gene but is deficient in the disseminative potency.

Such complexes defective in certain viral genes can be recovered and amplified from cells which express the corresponding (to the deleted genes) structural proteins to complement the defects of the recombinant virus genes. Taking embryonated avian eggs into consideration as the most suitable host for proliferating such a defective, recombinant Sendai virus to a high titer, it is considered that transgenic avians, their eggs and cells which carry at least one or more genes out of M, F and HN genes of Sendai virus on chromosome are suitable for amplifying the complexes. Methods for preparing transgenic avians have been reported [Poultry Sci., 65, 1445-1458 (1986); Bio/Technology, 12, 60-63 (1994)], and those skilled in the art should appropriately produce transgenic birds carrying at least one or more genes out of M, F and HN genes on their chromosomes.

The present invention also provides a method for preparing the complex described above. In the following, cases related to Sendai virus are exemplified. Genome of Sendai virus Z is a single stranded RNA comprising 15384 nucleotides. Its entire base sequence has been determined from cDNA clones prepared by using reverse transcriptase [Nucleic Acids Research, 11, 7313-7330 (1983); Nucleic Acids Research, 12, 7965-7972 (1984); Nucleic Acids Research, 14, 1545-1563 (1986)]. Since its genome RNA is a negative strand, a group of enzymes and proteins are required to transcribe the genome. The newly made proteins (N, P, and L) from the primary transcripts replicate and encapsidate the nascent antigenomic RNA strand. This antigenome, in turn, is replicated to a new genome strand by the same N, P, and L proteins. At least six proteins including NP, P, M, F, HN, and L are known as proteins encoded by the genome RNA. It has been

elucidated that, of these proteins, NP, P and L are factors essential and sufficient for replication [Journal of Virology, 68, 8413-8417 (1994)], and M, F and HN are components necessary for constructing the viral structure. Based on these facts, when a specific RNA virus from which RNA is derived is Sendai virus, it is possible to reconstruct an infectious complex by transferring both 1) cDNA transcribable to RNA and a gene encoding the RNA polymerase necessary for transcribing said RNA within cells or 2) an RNA molecule itself transcribed from said cDNA *in vitro* into cells wherein all the genes for the autonomous replication, NP, P, and L, and a group of genes, out of M, F and HN genes, that had been deleted to restrict cell to cell dissemination, are expressed. In this case, all these transacting genes, NP, P, L, M, F, and HN, may be transiently expressed by transfecting cells with the plasmids coding for the respective genes. However, genes related to disseminative capability at least are preferably incorporated into cellular chromosomes to be stably expressed.

The complex reconstituted as above can be produced to a high titer, by infecting cells which express genes, one or some of M, F, and HN genes, which had been deleted in the recombinant virus. Transgenic avian eggs expressing said group of genes are preferable for this purpose to produce the complex in a large scale.

In addition, M, F, and HN genes expressed in cells and animals are not necessarily of the wild-type Sendai virus. Any of those with functions equivalent to those of the wild-type will be usable. That is, any gene may be used where said gene has complementarity to the function of Sendai virus gene deleted to make the virus nondegenerating. Preferable cells to be used are host cells for Sendai virus. Any cells can be theoretically used, if they are sufficiently susceptible to and permissive for Sendai virus infection and replication, to express M, F, and/or HN genes, and complement the defect of the recombinant Sendai virus intracellularly produced.

Hitherto only the enhancement of expression efficiency has been emphasized with conventional RNA virus vectors, and little efforts have been made for developing compounds to suppress the RNA replication to prevent unfavorable results due to excessive expression.

As the "RNA replication inhibitor" of the present invention, any drugs to inhibit RNA-dependent RNA replication may be applied, and, for example, Ribavirin, TJ13025, etc. are used. Such replication inhibitors are effective, for example, when health deterioration is noticed with the cellular amplification of recombinant RNA, or when the down-regulation of intracellular expression of foreign genes derived from recombinant RNA is required.

As an embodiment of the present invention, processes for reconstituting the complex of the present invention from cDNA with the M gene deleted of Sendai virus (steps A-B), and those for amplifying said complex (steps B-C) are shown in Fig. 1.

In the following, the present invention will be concretely described with

reference to Examples, but not be limited to them.

**Example 1. Preparation of Sendai virus cDNA plasmids pUC18/T7(-)HVJRz.DNA and pUC18/T7(+)HVJRz.DNA**

Plasmid pUC18/T7(-)HVJRz.DNA was constructed by inserting a DNA molecule comprising T7 RNA polymerase promotor, Sendai virus cDNA designed to be transcribed to the negative strand RNA and the ribozyme gene in this order into pUC18 vector. Also, plasmid pUC18/T7(+)HVJRz.DNA was constructed by inserting a DNA molecule comprising T7 RNA polymerase promotor, Sendai virus cDNA designed to be transcribed to the positive strand RNA and the ribozyme gene in this order into pUC18 vector. Constructions of pUC18/T7(-)HVJRz.DNA and pUC18/T7(+)HVJRz.DNA are shown in Figs. 2 and 3, respectively.

**Example 2. Reconstitution experiment of Sendai virus from cDNA**

LLC-MK2 cells ( $2 \times 10^6$ ) trypsinized in a usual manner were placed in a 60-mm diameter plastic dish, and incubated in MEM medium (MEM supplemented with 10% FBS) (10 ml) in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C for 24 h. After removing the medium and washing with PBS (1 ml), a suspension of recombinant vaccinia virus vTF7-3 expressing T7 polymerase in PBS (0.1 ml) was added to the cells at the multiplicity of infection (moi) of 2. The dish was gently agitated every 15 min to thoroughly spread the viral solution for 1 h infection. After removing the viral solution and washing with PBS (1 ml), a medium containing cDNA, which was prepared as follows, was added to the dish.

Nucleic acids shown in Tables 1 and 2 (containing plasmids expressing factors required for the replication of Sendai virus, pGEM-L, pGEM-P, and pGEM-NP; were placed in a 1.5-ml sampling tube, and adjusted to a total volume of 0.1 ml with HBS (Hepes buffered saline; 20 mM Hepes pH 7.4 containing 150 mM NaCl). In those tables, (-) and (+)cDNAs represent plasmids pUC18/T7(-)HVJRz.DNA and pUC18/T7(+)HVJRz.DNA, respectively, and /C and /L indicate that cDNA is introduced into cells in the circular form and linear form after digestion of those two plasmids with restriction enzyme MluI, respectively.

On the other hand, in a polystyrene tube were placed HBS (0.07 ml), DOTAP (Boehringer Mannheim) (0.03 ml). To this tube was added the nucleic acid solution described above, and the mixture was left standing as such for 10 min. Then, to this mixture was added the cell culture medium described above (2 ml, MEM supplemented with 10% FBS) followed by the vaccinia virus inhibitors, rifampicin and cytosine arabinoside C (C/Ara/C), to the final concentrations of 0.1 mg/ml and 0.04 mg/ml, respectively, resulting in the preparation of the medium containing cDNA described above. The dish described above was incubated in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C for 40 h. The cells in the dish were harvested using a rubber policeman, transferred to an Eppendorf tube, sedimented by centrifuging at 6,000 rpm for 5 min, and re-suspended in PBS (1 ml). Aliquots of this cell suspension, as such or after diluted, were inoculated to 10-days old developing embryonated chicken eggs. That is, the cell suspension was diluted with PBS to the cell numbers shown in Table 1, and eggs inoculated with its 0.1 to 0.5-ml aliquots were incubated at 35°C for 72 h, then at 4°C overnight. Chorio-allantoic fluid was recovered as the source of reconstituted virus from these eggs using a

syringe with a needle.

Hemagglutinin unit (HAU) and plaque forming unit (PFU) of the recovered virus solution were assayed as follows. HAU was determined as follows. Chicken blood was centrifuged at 400 x g for 10 min and the supernatant was discarded. Precipitates thus obtained were suspended in 100 volumes of PBS(-), and centrifuged at 400 x g for 10 min to discard the supernatant. This procedure was repeated twice to prepare an 0.1% blood cell solution in PBS. Two-fold serial dilutions of virus solutions were prepared, and 0.05 ml each dilution to be assayed was dispensed into each well of 96-well titer plate. The blood cell solution (0.05 ml each) was further added to each well, gently swirled to ensure a thorough mixing, and left at 4°C for 40 min. The reciprocals of the highest virus dilution to cause the hemagglutination observable with the naked eye was taken as HAU.

PFU was assayed as follows. CV-1 cells were grown to a monolayer on a 6-well culture plate. After the culture medium was discarded, a virus solution 10-fold serially diluted (0.1 ml each) was dispensed into each well of the culture plate to infect the cells at 37°C for 1 h. During the infection, a mixture of 2 x MEM free of serum and melted 2% agar (55°C) was prepared, and trypsin was added to the mixture to a final concentration of 0.0075 mg/ml. After 1 h infection and removal of the virus solution, the culture medium mixed with agar (3 ml each) was added to each well of the culture plate, and incubated under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C for 3 days. Phenol red (0.1%) (0.2 ml) was added to each well, incubated at 37°C for 3 h, and then removed. Unstained plaques were counted to estimate the virus titer as PFU/ml.

Table 1 shows Sendai virus template cDNAs transfected into LLC-2 cells, amounts of cDNA factors, pGEM-L, pGEM-P, and pGEM-NP, required for the RNA replication, incubation time, cell numbers inoculated to chicken eggs, HAU and PFU values recovered into the allantoic fluid.

Table 1								
Template cDNA amount (μg)		pGEM -L (μg)	pGEM -P (μg)	pGE M -NP (μg)	Incubation time (h)	Amount of cells	HAU	PFU
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	1.00x10 <sup>5</sup>	512	2x10 <sup>9</sup>
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	1.00x10 <sup>5</sup>	256	9x10 <sup>8</sup>
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	1.00x10 <sup>6</sup>	256	9x10 <sup>8</sup>
(+)cDNA/L	10	4	2	4	40	1.00x10 <sup>5</sup>	□2	□10
(+)cDNA/L	10	4	2	4	40	1.00x10 <sup>5</sup>	□2	□10
(+)cDNA/L	10	4	2	4	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10
(-)cDNA/L	10	4	2	4	40	1.00x10 <sup>4</sup>	□2	□10

(-)cDNA/L	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^5$	□2	□10
(-)cDNA/L	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^6$	□2	□10
(-)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^4$	□2	□10
(-)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^5$	□2	□10
(-)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^6$	4	$8 \times 10^3$

Samples showing both HAU and PFU were sedimented by ultra-centrifugation, re-suspended, purified by a sucrose density gradient centrifugation from 20% to 60%. The viral proteins of thus purified virions were fractionated by 12.5% SDS-PAGE. Each viral protein recovered from cDNAs samples was the same in size as that of the conventional Sendai virus.

These results demonstrated that Sendai virus can be reconstituted by introducing cDNAs into cells, and that virus particles are more efficiently reconstituted by introducing cDNAs transcribing positive strand RNAs as compared with those transcribing negative strand RNAs, and further by introducing cDNAs in the circular form rather in the linear form. The coexisting vaccinia virus in an amount of ca  $10^4$  PFU/ml in the allantoic fluid was readily eliminated by the virus once again in eggs at a dilution of  $10^{-7}$  or  $10^{-8}$ . This limiting dilution protocol was used to prepare vaccinia-free stock of recovered Sendai virus in this and all subsequent studies.

### Example 3. Survey of RNA replication factors required for Sendai virus reconstitution

Experiments were performed to examine whether all three plasmids expressing the L, P, and NP proteins were required for the reconstitution of Sendai virus. Experimental methods were similar to those described in Example 2 except that any combinations of two out of pGEM-L, pGEM-P, and pGEM-NP plasmids or only one out of them, instead of all these three combined as in Example 2, were introduced together with a template cDNA into cells.

Table 2 shows Sendai virus template cDNAs introduced into LLC-MK2 cells, amounts of the cDNA plasmids required for RNA replication in trans, incubation time, number of cells inoculated into chicken eggs, and values of HAU and PFU.

Table 2

Template cDNA amount (μg)		pGEM -L	pGEM -P	pGEM -NP	Incubation time (h)	Number of cells inoculated	HAU	PFU
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^5$	256	$6 \times 10^8$
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1.00 \times 10^6$	512	$4 \times 10^9$
(+)cDNA/C	10	0	2	4	40	$1.00 \times 10^6$	□2	□10

(+)cDNA/C	10	0	2	4	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10
(+)cDNA/C	10	4	0	4	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10
(+)cDNA/C	10	4	0	4	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10
(+)cDNA/C	10	4	2	0	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10
(+)cDNA/C	10	4	2	0	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10
(+)cDNA/C	10	0	0	4	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10
(+)cDNA	10	0	0	4	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10
(+)cDNA/C	10	0	2	0	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10
(+)cDNA/c	10	0	2	0	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10
(+)cDNA/C	10	4	0	0	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10
(+)cDNA/C	10	4	0	0	40	1.00x10 <sup>6</sup>	□2	□10

As shown in Table 2, no virus reconstitution was observed by introducing any combinations of two out of these three factors into cells, confirming the necessity of all three proteins L, P, and NP for the virus reconstitution.

#### Example 4. Reconstitution experiment of Sendai virus *in vitro* from transcribed RNAs

Since the reconstitution of Sendai virus from the functional cDNA clones was described in Example 2, it was further examined whether transcription products of said cDNAs *in vitro*, that is, v or (-)RNA and c or (+)RNA, can initiate and support similar reconstitution.

After the Sendai virus cDNA plasmids, pUC18/T7(-)HVJRz.DNA and pUC18/T7(+)HVJRz.DNA, were linearized with restriction enzyme M1ul, using these DNAs as templates, RNA synthesis was performed *in vitro* with a purified T7 polymerase preparation (EPICENTRE TECHNOLOGIES: Ampliscribe T7 Transcription Kit). The method for synthesizing *in vitro* RNAs essentially followed the protocols provided with the kit. Using RNA products thus obtained in place of cDNAs in Example 2, similar experiments were performed, and the virus production was estimated by HA test. Results are shown in Table 3.

Table 3



Template cDNA amount (μg)		pGEM -L (μg)	pGEM - P (μg)	pGEM -NP (μg)	Incubation time (h)	Number of cells inoculated	HA U	PFU
in vitro (-)RNA	10	4	2	4	40	1.00x10 <sup>6</sup>	512	2x10 <sup>9</sup>
in vitro (-)RNA	10	4	2	4	40	1.00x10 <sup>6</sup>	512	ND
in vitro (+)RNA	10	4	2	4	40	1.00x10 <sup>6</sup>	2	5x10 <sup>3</sup>
in vitro (+)RNA	10	4	2	4	40	1.00x10 <sup>6</sup>	<2	ND

These results indicate that virus can be reconstituted by introducing either negative or positive sense strand RNAs into cells.

#### Example 5. Expression of foreign genes inserted into Sendai viral vectors in host cells

1. Preparation of Sendai virus vector "pSeVgp120" inserted with a foreign gene, the gp120 of human immunodeficiency virus type 2 (HIV)

Using a set of primers comprising primer a (5'-TGCGGCCGCGGTACGGTGGCAATGAGTGAAGGAGAAGT-3') (SEQ ID NO:1) and primer d (5'-TTGCGGCCGCGATGAACCTTCACCCTAAGTTTTTTATTACTACGGCG-TACGTCATCTTTTTTCTCTCTGC-3') (SEQ ID NO:2), the HIV-1gp120 gene was amplified on "pN1432" or a full-length cDNA of HIV-1 strain NL43 by the standard PCR techniques. PCR products were subjected to TA cloning, digested with NotI, and then inserted into the NotI site of "pSeV18<sup>+</sup>". pSeV18<sup>+</sup> contains an additional 18 nucleotide sequence with a unique NotI restriction site which is placed before the ORF of NP gene of pUC/T7(+)HVJRz. Then, *E. coli* cells were transformed with this recombinant plasmid. DNAs were extracted from each colony of *E. coli* by the "Miniprep" method, digested with DraIII, and then electrophoresed. Positive clones (designated "clone 9" hereafter) were selected by confirming to contain DNA fragments of the size expected from the insertion. After DNA fragments were confirmed to have the authentic nucleotide sequence, DNAs were purified by a cesium chloride density gradient centrifugation. pSeV18<sup>+</sup> inserted with the gp120 gene is designated "pSeVgp120" hereafter.

2. Reconstitution of Sendai virus containing pSeVgp120 (SeVgp120) and analysis of gp120 expression

Reconstitution of the virus from pSeVgp120 in LLCMK2 cells, the virus recovery from allantoic fluid of embryonated chicken eggs, and assay of the viral HAU were done exactly as described in Example 2. The recovered virus was also examined for the expression of gp120 by ELISA as follows.

Samples (100 μl each allantoic fluid) were dispensed into each well of a 96-well plate which had been coated with monoclonal antibody against HIV-1, and incubated at 37°C for 60 min. After washing with PBS, HRP-linked anti-HIV-1

antibody (100 µl each) was added to each well, and incubated at 37°C for 60 min. After washing with PBS, tetramethylbenzidine was added to each well, and amounts of reaction product converted by the action of HRP under acidic conditions were determined by following the optical density at 450 nm to estimate the expression amount of gp120. Results are shown in the left-hand column in Table 4.

The virus solution thus obtained was inoculated to CV-1 cells, and similarly examined for gp120 expression as follows. CV-1 cells were dispensed to a culture plate at  $5 \times 10^5$  cells/plate, grown, and then the culture medium was discarded. After washing with PBS(-), the viral solution was added to the cells at the multiplicity of infection of 10, and incubated at 37°C for 1 h. After the virus solution was discarded, washed with PBS(-), a plain MEM medium (MEM medium supplemented with antibiotics AraC and Rif, and trypsin) was added to the cells, and incubated at 37°C for 48 h. After the reaction, the medium was recovered and assayed for HAU (by a similar method as described in Example 2) and examined for the expression of gp120 (by ELISA). Results are shown in the center column of Table 4. In addition, the supernatant of CV-1 cell culture medium was inoculated to embryonated chicken eggs again, and the virus solution thus obtained was assayed for HAU and also examined for the gp120 expression (by ELISA). Results are shown in the right hand column of Table 4.

Table 4

Allantoic fluid (F1) gp120 (HAU)	CV-1 medium (F1) gp120 (HAU)	(µg/ml)
		Allantoic fluid (F2) gp120 (HAU)
0.10 (4)	3.46 (128)	
0.15 (32)	1.81 (128)	1.56, 1.21 (512, 512)
0.05 (32)	2.20 (128)	

As shown in Table 4, markedly high concentrations of gp120 were detected in CV-1 cells in culture (center column of the Table), and also in the allantoic fluids from embryonated chicken eggs inoculated again with the virus (right-hand column of the Table). In the left-hand and center columns of the Table are shown the mean values of three clones.

Furthermore, the expression of gp120 was analyzed by Western blotting. After the culture medium of CV-1 cells infected with SeVgp120 was centrifuged at 20,000 rpm for 1 h to sediment virus, the supernatant was treated with either TCA (10%, v/v) for 15 min on ice or 70% ethanol at -20°C, and centrifuged at 15,000 rpm for 15 min. Proteins thus precipitated were solved in an "SDS-PAGE sample buffer" (Daiichi Chemicals) at 90°C for 3 min, and then subjected to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Proteins thus fractionated were transferred to PVDF membranes (Daiichi Chemicals), reacted with monoclonal antibody 902 at room temperature for 1 h, and then washed with T-TBS. The membranes were reacted with anti-mIgG (Amersham) at room temperature for 1 h,

and washed with T-TBS,. The membranes were then reacted with HRP-linked protein A (Amersham) at room temperature for 1 h, washed with T-TBS, and 4-chloro-1-naphthol (4CNPlus) (Daiichi Chemicals) was added to detect gp120. As a result, protein bands were visualized at positions corresponding to the expected molecular weight of gp120.

In addition, effects of postinfection time of CV-1 cells transfected with SeVgp120 on the HAU value and gp120 expression amount were analyzed. CV-1 cells ( $5 \times 10^6$ ) dispensed to 10-cm plate were infected with SeVgp120 at the multiplicity of infection of 10, and the culture medium (1 ml each) was postinfectionally recovered at 30, 43, 53 and 70 h, mixed with an equal volume of the fresh medium, and subjected to HAU assay, gp120 expression examination (by ELISA) and Western blotting. Results are shown in Figure 4. As clearly shown in Fig. 3, the production of gp120 tends to increase with the increasing HA titer of Sendai virus.

**Example 6. Analyses of SeVgp120 propagation and gp120 production in various types of cells**

Using similar methods as those in Example 5 except for the use of various types of cells, HAU and gp120 expression levels (by ELISA) were assayed. Results are shown in Table 5.

Table 5

Cell type	Hours (postinfection)	HAU	rgp120 ( $\mu\text{g/ml}$ )
CV-1	96	32	2.5
LLCMK2	48	16	0.5
CHO	55	4	0.46
NIH3T3	48	4	0.25
MT4	24	16	0.8
MOLT4/	24	16	1.2

In the left-hand column of the Table are shown the postinfection times (hours) of various types of cells transfected with SeVgp120. As a result, SeVgp120 propagation and gp120 expression were detected in all types of cells tested.

**Example 7. Studies on the expression of luciferase gene inserted into the Sendai viral vector in host cells**

In order to isolate the luciferase gene for inserting to vectors, the luciferase gene bounded by the engineered NotI sites on both termini was constructed by the standard PCR using a set of primers [5'-AAGCGGCCGCGCAAAGTTCACGATGGAAGAC-3') (30mer) (SEQ ID NO: 3)] and [5'-TGCGGCCGCGATGAACTTTACCCC-TAAGTTTTTCTTACTACGGATTATTACAATTTGGAAGTTTCCGCCC-3' (69mer) (SEQ ID NO: 4) with the minigenome encoding plasmid, "pHvluciRT4", as a

template. The PCR product was cloned into the NotI window of pSeV18<sup>+</sup> to obtain a recombinant Sendai virus vector to which the luciferase gene is inserted. Then, this recombinant vector was transfected into LLCMK2 cells, and after 3 cycles of freezing and thawing, the cells were inoculated into embryonated chicken eggs. Chorio-allantoic membranes of developing eggs were excised out, twice washed with cold PBS(-), and, after the addition of lysis buffer (Picagene WAKO) (25  $\mu$ l) and thorough mixing, centrifuged at 15,000 rpm for 2 min. To the supernatant (5  $\mu$ l each) was added the substrate (IATRON) (50  $\mu$ l), and the mixture was dispensed into each well of a 96-well plate. Fluorescent intensity was measured with a luminometer (Luminous CT-9000D, DIA-IATRON), and the enzyme activity was expressed as counts per second (CPS). As a result, an extremely high luciferase activity was detected. The egg grown recombinant virus was purified by passaging once again in eggs, so that the stock virus did not contain helper vaccinia virus. This stock virus was then used to infect CV-1 cells and examine luciferase expression in these cells. As shown in Table 6, again, extremely high luciferase activity was detected for infected CV-1 cells at 24-h postinfection (Table 6). In these experiments, Sendai virus which did not carry the luciferase gene was used as control (represented by "SeV" in the table). Results obtained from two clones are shown in the table.

Table 6

Fluorescence intensity (counts/10 sec)

	Chorio-allantoic membrane	CV-1 (24h postinfection)
Luc/SeV	669187	
	2891560	8707815
SeV	69	48
	23	49

In the present invention, a system has been established allowing the efficient rescue of viral particles from cDNAs of negative strand viruses, and also a method has been developed enabling the production and amplification of "complexes comprised of RNAs derived from disseminative specific negative strand RNA virus and viral structural components containing no nucleic acids so as to have the infectivity and autonomous RNA replicating capability but no disseminative potency". Since said complexes can replicate only within infected cells but not spread from cell to cell, these techniques are especially useful in the fields of gene therapy, etc. wherein therapeutical safety is highly appreciated.

**SEQUENCE LISTING**

**(1) GENERAL INFORMATION:**

**(i) APPLICANT: NAGAI, Yoshiyuki**

KATO, Atsushi

MURAI, Fukashi

ASAKAWA, Makoto

SAKATA, Tsuneaki

HASEGAWA, Mamoru

SHIODA, Tatsuo

**(ii) TITLE OF INVENTION: Negative Strand RNA Viral Vector Having Autonomous Replication Capability**

**(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4**

**(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:**

(A) ADDRESSEE: Clark & Elbing LLP

(B) STREET: 176 Federal Street

(C) CITY: Boston

(D) STATE: MA

(E) COUNTRY: U.S.A.

(F) ZIP: 02110-2214

**(v) COMPUTER READABLE FORM:**

(A) MEDIUM TYPE: Diskette, 3.5 inch, 1.44 MB storage

(B) COMPUTER: IBM compatible

(C) OPERATING SYSTEM: MS-DOS ver 3.30 or later

(D) SOFTWARE:

**(vii) PRIOR APPLICATION DATA:**

(A) APPLICATION NUMBER: JP HEI 7-308315

(B) FILING DATE: 31-OCT-1995

**(vii) PRIOR APPLICATION DATA:**

(A) APPLICATION NUMBER: PCT/JP96/03068

(B) FILING DATE: 22-OCT-1996

**(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1**

**(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:**

(A) LENGTH: 38

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear  
 (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid (synthetic DNA)  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1  
 TGCGGCCGCC GTACGGTGGC AATGAGTGAA GGAGAAGT

38

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 69
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid (synthetic DNA)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2

TTGCGGCCGC GATGAACTTT CACCCTAAGT TTTT VT TACT ACGGCGTACG  
 TCATCTTTTT 60

TCTCTCTGC

69

(2) INFORMATION FOR SEQ ID

NO: 3

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS

- (A) LENGTH: 30
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid (synthetic DNA)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3

AAGCGGCCGC CAAAGTTCAC GATGGAAGAC

30

(2) INFORMATION FOR SEQUENCE ID NO: 4

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 69
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid (synthetic DNA)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4

TGCGGCCGCG ATGAACTTTC ACCTAAGTT TTTCTTACTA CGGATTATTA  
CAATTGAC 60 TTTCCGCCC 69

**WHAT IS CLAIMED IS:**

1. A complex comprising an RNA molecule derived from a specific disseminative negative strand RNA virus and viral structural components containing no nucleic acid, having the cell infectivity and capable of autonomously replicating RNA, but deficient in the disseminative capability.
2. The complex of Claim 1, wherein said specific RNA virus is a negative strand RNA having non-segmented genome.
3. The complex of Claim 1, wherein said specific RNA virus is Sendai virus.
4. An RNA molecule comprising Sendai viral RNA or its complementary RNA, wherein said RNA molecule is defective in that at least one or more than one gene coding for each of the M, F, and HN proteins are deleted or inactivated.
5. A complex comprising the RNA molecule of Claim 4 and viral structural components derived from Sendai virus containing no nucleic acid, having the cell infectivity and capable of autonomously replicating RNA, but deficient in disseminative capability.
6. A DNA molecule comprising a template DNA capable of transcribing the RNA molecule of Claim 4 in vitro or in vivo.
7. The complex of any one of Claims 1-3 or 5, wherein the RNA molecule contained in said complex comprises a foreign gene.
8. The complex of Claims 3 or 5, wherein the RNA molecule contained in said complex comprises a foreign gene.
9. The RNA molecule of Claim 4 comprising a foreign gene.
10. The DNA molecule of Claim 6 comprising a foreign gene.
11. An inhibitor for RNA replication contained in the complex of any one of Claims 1-3, 5, 7 or 8 comprising an inhibitory agent for the RNA-dependent RNA replication.
12. A host whereto the complex of any one of Claims 1-3, 5, 7 or 8 can disseminate.
13. The host of Claim 12 comprising genes for the infectivity of the complex of any one of Claims 1-3, 5, 7 or 8 on its chromosomes, and capable of replicating the same copies of said complex when infected with it.
14. The host of Claims 12 or 13, wherein said host is animals, or cells, tissues, or embryonated eggs derived from it.
15. The host of Claim 14 wherein said animal is mammalian.
16. The host of Claim 14 wherein said animal is avian.
17. A host expressing genes for the infectivity of the complex of any one of Claims of 3, 5, or 8, and capable of replicating the same copies of said complex when infected with it.
18. A host comprising more than one gene of the M, F, and HE genes derived



from Sendai virus or genes having functions equivalent to them on its chromosomes.

19. A host comprising the M, F, or HN gene of Sendai virus or each of their functional equivalent genes on its chromosomes.

20. A host comprising the M, NP, P and L genes of Sendai virus on its chromosomes (wherein each gene may be substituted with its functional equivalent, respectively).

21. A host comprising the M, F and HN genes of Sendai virus on its chromosomes (wherein each gene may be substituted with its functional equivalent, respectively).

22. A host comprising the M, F, HN, NP, P and L genes on its chromosomes (wherein each gene may be substituted with its functional equivalent, respectively).

23. The host of any one of Claims 17-22, wherein said host is animal, or cell, tissue or egg derived from it.

24. The host of Claim 23, wherein said animal is mammalian.

25. The host of Claim 23, wherein said animal is avian.

26. A kit consisting of the following three components,

a. the RNA molecule contained in the complex of any one of Claims 1-3, 5, 7 or 8, or cRNA of said RNA, or a unit capable of biosynthesizing said RNA or said cRNA,

b. enzymes required for replicating said RNA or said cRNA, or a unit capable of biosynthesizing said enzymes, and

c. proteins related to the infectivity of said complex, or a unit capable of biosynthesizing said proteins.

27. A kit consisting of the following three components,

a. the RNA molecule contained in the complex of any one of Claims 1-3, 5, 7 or 8, or cRNA of said RNA, or a unit capable of biosynthesizing said RNA or said cRNA,

b. enzymes required for replicating said RNA or said cRNA, or a unit capable of biosynthesizing said enzymes, and

c. the host of any one of Claims 12-25.

28. A kit consisting of the following two components,

a. the complex of any one of Claims 1-3, 5, 7 or 8, and

b. the host of any one of Claims 12-25.

29. A kit consisting of the following three components,

a. the RNA molecule contained in any one of Claims 3, 5 or 8, or cRNA of said RNA, or a unit capable of biosynthesizing said RNA or said cRNA,

b. all NP, P and L proteins of Sendai virus or a unit capable of biosynthesizing

said proteins, and

c. proteins related to the infectivity of said complex, or a unit capable of biosynthesizing said proteins.

30. A kit consisting of the following three components,

a. the RNA molecule contained in the complex of any one of Claims 3, 5 or 8, or cRNA of said RNA, or a unit capable of biosynthesizing said RNA or said cRNA,

b. all NP, P and L proteins of Sendai virus, or a unit capable of biosynthesizing said proteins, and

c. the host of any one of Claims 17-25.

31. A kit consisting of the following two components,

a. the complex of any one of Claims 3, 5 or 8, and

b. the host of any one of Claims 17-25.

32. A method for producing the complex of any one of Claims 1-3, 5, 7 or 8 by introducing all three components of Claims 26a, 26b and 26c into a host.

33. A method for producing the complex of any one of Claims 1-3, 5, 7 or 8 by introducing both components of Claims 27a and 27b in the host of Claim 27c.

34. A method for amplifying and producing the complex of Claim 28a by transfecting said complex to the host of Claim 28b.

35. A method for producing the complex of any one of Claims 3, 5 or 8 by introducing the three components of Claims 29a, 29b and 29c into a host.

36. A method for producing the complex of any one of Claims 3, 5 or 8 by introducing both components of Claims 30a and 30b into the host of Claim 30c.

37. A method for amplifying and producing the complex of Claim 31a by transfecting said complex into the host of Claim 31b.

38. The RNA molecule of Claim 9 wherein a gene corresponding to the M, F, or HN gene is deleted or inactivated.

39. The RNA molecule of Claim 9 wherein all the genes corresponding to the M, F, and HN genes are deleted or inactivated.

40. A kit consisting of the following three components,

a. the RNA molecule of Claim 38,

b. the host of Claim 20, and

c. the host of Claim 19.

41. A method for preparing a complex by introducing the RNA molecule of Claim 40a into the host of Claim 40b, and amplifying and producing said complex by transfecting it to the host of Claim 40c.

42. A complex produced by the method of Claim 41.

43. A kit consisting of the following three components,

- a. the RNA molecule of Claim 39,
- b. the host of Claim 22, and
- c. the host of Claim 21.

44. A method for amplifying and producing a complex by introducing the RNA molecule of Claim 43a into the host of Claim 43b, and amplifying and producing said complex by transfecting it to the host of Claim 43c.

45. A complex produced by the method of Claim 44.

46. An inhibitor for RNA replication contained in the complex of Claims 42 or 45 comprising an inhibitory agent of the RNA-dependent RNA polymerase.

47. A method for preparing foreign proteins, wherein said method comprises processes of introducing the complex of Claim 7 to a host and recovering the expressed proteins.

48. The method for preparing foreign proteins of Claim 47, wherein the host is a cell expressing a group of genes, from among those related to the disseminative capability, which are deficient in the RNA molecule contained in the complex of Claim 7.

49. A culture medium or allantoic fluid containing the expressed foreign proteins, wherein said culture medium or allantoic fluid is obtained by transfecting the complex of Claim 7 to a host and recovering its culture medium or allantoic fluid.

### ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

A method for reconstituting Sendai viral particles by transfecting Sendai virus to a host expressing all genes for the initial replication has been developed, enabling the production of negative strand RNA vectors highly useful for practical applications.